



DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

TESIS DOCTORAL

**ANÁLISIS DE LA BASE EPIGENÉTICA DE LA ENFERMEDAD DE HIRSCHSPRUNG
MEDIANTE UNA ESTRATEGIA COMBINADA: LA APLICACIÓN DE
SECUENCIACIÓN MASIVA Y EL ANÁLISIS DE LOS MECANISMOS CELULARES Y
MOLECULARES IMPLICADOS EN EL DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO
ENTÉRICO**

Doctoranda: Leticia Villalba Benito

Directora: Salud Borrego López

Departamento: Cirugía, Universidad de Sevilla

Programa de doctorado: Biología Molecular, Biomedicina e Investigación Clínica

Sevilla, 2017

ÍNDICE

ÍNDICE	2
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 SISTEMA NERVIOSO ENTÉRICO	3
1.1.1 Principales rutas de señalización y factores implicados en el desarrollo del SNE	7
1.1.2 Regulación epigenética durante el desarrollo del SNE.....	12
1.2 NEUROCRISTOPATÍAS	19
1.2.1 Etiopatología y características clínicas de la enfermedad de HSCR.....	20
1.2.2 Epidemiología de HSCR.....	23
1.2.3 Genética molecular de HSCR.....	25
1.2.4 Epigenética en HSCR	29
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	35
2.1 HIPÓTESIS DE TRABAJO	37
2.2 OBJETIVOS	37
3. METODOLOGÍA	41
3.1 PACIENTES Y CONTROLES.....	43
3.1.1 Pacientes HSCR.....	43
3.1.2 Individuos control.....	44
3.2 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN – RATONES	44
3.3 TÉCNICAS GENERALES UTILIZADAS PARA ESTUDIOS MOLECULARES DE ADN GENÓMICO	44
3.3.1 Extracción de ADN a partir de sangre periférica.....	44
3.3.2 Espectrofotometría de ADN	44
3.3.3 Amplificación de ADN genómico mediante PCR	45
3.3.4 Electroforesis en gel.....	46
3.3.5 Secuenciación automática de los productos de PCR.....	46
3.4 EXTRACCIÓN DE PRECURSORES NEURALES CRECIDOS COMO NLBS A PARTIR DEL SNE HUMANO Y DE RATÓN	48
3.4.1 Extracción de ARN mensajero (ARNm) y síntesis de ADN complementario (ADNc) a partir de cultivos de precursores de SNE.....	50
3.4.2 Estudios de expresión - PCR cuantitativa a tiempo real.....	51
3.4.3 Silenciamiento mediante ARN short hairpin (shARN) expresados por vectores lentivirales	55
3.4.4 Inmunoprecipitación de cromatina y secuenciación (ChIP-Seq)	61
3.5 ANÁLISIS DE VARIANTES	69
3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO - EXPRESIÓN DE LOS DATOS Y SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA.....	70
3.7 OTRAS HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS UTILIZADAS.....	71
3.7.1 Ingenuity pathway analysis (IPA).....	71
3.7.2 Bases de datos	71
3.7.3 Análisis de secuencias.....	72

3.7.4	<i>Segregación familiar de variantes</i>	72
4.	RESULTADOS	75
4.1	SILENCIAMIENTO DE LA <i>DE NOVO</i> METILTRANSFERASA <i>DNMT3B</i> EN CPES DE RATÓN	77
4.1.1	<i>Expresión de Dnmt3b en CPes de ratón y su silenciamiento mediante una selección de partículas lentivirales</i>	77
4.1.2	<i>La bajada de expresión de Dnmt3b en las CPes no afecta a la diferenciación neuronal</i>	78
4.1.3	<i>La bajada de expresión de Dnmt3b en las CPes provoca un aumento de la proliferación y/o supervivencia celular</i>	79
4.1.4	<i>Identificación de los posibles mecanismos moleculares implicados en la supervivencia y/o proliferación celular regulados por DNMT3b en las CPes</i>	81
4.1.5	<i>DNMT3b regula el ciclo celular a través de la actividad de p53/p21</i>	83
4.1.6	<i>Expresión de P53 y P21 en pacientes HSCR</i>	85
4.2	IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES DIANA DE DNMT3B COMO POSIBLES GENES IMPLICADOS EN LA FORMACIÓN DEL SNE Y EN LA ENFERMEDAD DE HSCR	86
4.2.1	<i>Validación y cuantificación de las librerías procedentes de los ChIP-Dnmt3b y sus correspondientes Input</i>	86
4.2.2	<i>Secuenciación de nueva generación</i>	87
5.	DISCUSIÓN	111
5.1	POSIBLE PAPEL REGULADORIO DE DNMT3B DURANTE EL DESARROLLO DEL SNE	113
5.2	IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS GENES IMPLICADOS EN LA CORRECTA FORMACIÓN DEL SNE Y EN LA ENFERMEDAD DE HSCR	119
5.2.1	<i>Diferentes tipos de regiones genómicas como sitios de unión de DNMT3b a los genes dianas con posible papel en HSCR</i>	122
5.2.2	<i>Las dianas de DNMT3b identificadas en los precursores entéricos ponen de manifiesto una diversidad de mecanismos a través de los cuales regulan los procesos celulares implicados en el correcto desarrollo del SNE y por tanto su papel en HSCR</i>	125
5.2.3	<i>La identificación de variantes raras en los genes dianas de DNMT3b refuerza la posible implicación de los mismos en la aparición de HSCR</i>	138
6.	CONCLUSIONES	143
7.	BIBLIOGRAFÍA	151

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

5mC: 5 metilcitosina

7 div.: 7 días in vitro

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

ADNr: ADN ribosomal

AKT: Proteína Kinasa B

ARTN: Artemina

ARN: Ácido ribonucleico

ARNi: ARN interferente

ARNm: ARN mensajero

ARNr: ARN ribosomal

BCL-XL: *B-cell lymphoma-extra large*

BMP: *Bone Morphogenetic Protein* - Proteína morfogénica ósea

BNP: Borde de la Placa Neural

CCN: Células de la Cresta Neural

CNT: Cresta Neural Troncal

CNS: Cresta Neural Sacra

CNV: Cresta Neural Vagal

ChIP: *Chromatin immunoprecipitation* - Inmunoprecipitación de cromatina

ChIP-Seq: *Chromatin Immunoprecipitation Sequencing* - Inmunoprecipitación de cromatina y secuenciación

CpG: 5' – C – *phosphate* – G – 3' - Dinucleótido de citosina y guanina

CPN: Complejo del Poro Nuclear

Ct: *Cycle Threshold* - Ciclo umbral

DAPI: 4,6-diamidino-2-fenilindol

ddNTPs: *Dideoxynucleotides* - Dideoxinucleótidos

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DNMT: *DNA methyltransferase* - ADN metiltransferasa

Dom: *Dominant megacolon* - Megacolon dominante

dNTPs: *Deoxynucleotide triphosphates* - Desoxinucleótidos trifosfato

EDN3: *Endothelin 3* - Endotelina 3

EDNRB: *Endothelin Receptor type B* - Receptor de endotelina tipo B

EED: *Embryonic ectoderm development* - Desarrollo del ectodermo embrionario

EGF: *Epidermal Growth Factor* - Factor de crecimiento epidérmico

- ERK:** *Extracellular signal-Regulated Kinase* – Quinasa regulada por señal extracelular
- FBS:** *Fetal Bovine Serum* - Suero fetal bovino
- FGF:** *Fibroblast Growth Factor* - Factor de crecimiento derivado de fibroblasto
- GDNF:** *Glial cell-Derived Neurotrophic Factor* - Factor neurotrófico derivado de glía
- GFAP:** *Glial Fibrillary Acidic Protein* - Proteína ácida fibrilar glial
- GFLs:** *GDNF-Family Ligands* - Ligandos de RET de la familia de GDNF
- GFR α :** *GDNF Receptor- α* - Receptores α de GDNF
- H3K27me3:** *Histone 3 lysine 27 trimethylation* - Trimetilación del complejo histona 3 lisina 27
- Hh:** *Hedgehog*
- HS:** *Heparan Sulfate* - Heparán sulfato
- HSPG:** *Heparan Sulfate Proteoglycans* - Proteoglicanos heparán sulfato
- HSCR:** Enfermedad de Hirschsprung
- IA:** intestino anterior
- IHH:** *Indian Hedgehog*
- ICF:** *Immunodeficiency, Centromeric instability and Facial anomalies syndrome* - Síndrome de inmunodeficiencia, inestabilidad de la región centromérica y anomalías faciales.
- IM:** Intestino medio
- Indels:** *Insertions and Deletions* - Inserciones y deleciones
- IP:** Intestino posterior
- IPA:** *Ingenuity pathway analysis*
- Ig:** Inmunoglobulina
- L-HSCR:** *Long segment HSCR* - HSCR de segmento largo
- LncARN:** *Long Non Coding RNA*- ARN largos no codificantes
- LV-:** *Non-Target Control Transduction Particles* – Partículas de transducción de control sin diana
- LV:** *Dnmt3b-shRNA* - Dnmt3b-shARN
- MAF:** *Minor Allele Frequency* - Frecuencia alélica menor
- MACS:** *Model-based Analysis of ChIP-Seq*
- MAPK:** *Mitogen-Activated Protein Kinase* - Proteína quinasa activada por mitógenos
- MBDs:** *Methyl-CpG-Binding Domain proteins* - Proteínas con dominio de unión a CpG metilado
- MCP:** Muerte Celular Programada
- MCPH:** *Microcephaly Primary Hereditary* - Microcefalia primaria humana
- MEN2A:** *Multiple Endocrine Neoplasia Type 2* - Neoplasia endocrina múltiple tipo 2A
- MFE:** *Minimum Free Energy* - Mínima energía libre
- MGI:** *Mouse Genome Informatics*

MiARN: Micro ARN

MOI: *Multiplicity Of Infection* - Multiplicidad de infección

NaOH: Hidróxido sódico

NB: Neuroblastoma

NcARN: *Non Coding RNA* - ARN no codificantes

Nedd: *NPC-Expressed, Developmentally Down-regulated*

NLBs: *Neuroespheres Like Bodies* - Neuroesferas

NRTN: Neurturina

PAPST: *Peak Assignment and Profile SearchTool*

PAVIS: *Peak Annotation and Visualization*

P75: Receptor de células precursoras entéricas

pb: Par de Bases

PBS: *Phosphate Buffered Saline* - Tampón fosfato salino

PCR: *Polymerase Chain Reaction* - Reacción en cadena de la polimerasa

Pol: ARN polimerasa

PRC: *Polycomb Repressive Complex* - Complejo represivo polycomb

PI3K: Phosphatidilinositol 3-Kinasa

PSPN: Persefina

RISC: *RNAi-Induced Silencing Complex* - Complejo de silenciamiento inducido por ARNi -

S-HSCR: *Short segment HSCR* - HSCR de segmento corto

SAH: S-adenosyl-l-homocisteína

SAM: S-adenosil-l-metionina

SCA12: *Spinocerebellar Ataxia Type 12* - Ataxia espinocerebelar tipo 12

SD: Síndrome de Down

SEM: *Standard Error of the Mean* - Error estándar de la media

SHH: *Sonic hedgehog*

shARN: *Short Hairpin RNA*- ARN de horquilla corta

siARN: *Small Interfering RNA* - ARN pequeño de interferencia

SMA: *Smooth Muscle Actin* - Actina de músculo liso

SNC: Sistema Nervioso Central

SNA: Sistema Nervioso Autónomo.

SNE: Sistema Nervioso Entérico.

SNVs: *Single Nucleotide Variants* - Variantes de nucleótido simple

SOX10: *Sex determinig region Y box 10*

STAT3: *Signal Transducer and Activator of Transcription 3* - Transductor de señal y activador de la transcripción 3

SW: Síndrome de Waardenburg

TBS: *Tris Buffered Saline* - Solución salina tamponada con Tris

TCA: *Total Colonic Aganglionosis* - Aganglionosis total de colon

TCS: Síndrome de Treacher Collins

TEM: Transición Epitelial-Mesenquimal

TET: *Ten-Eleven Translocation*

TG: Tris/Glicina

TLDA: *TaqMan Low Density Array*- Matriz de baja densidad Taqman

Tuj1: β -III-tubulina.

UTR: *Untranslated Region* - Región no traducida

WES: *Whole Exome Sequencing* - Secuenciación de exoma completo

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Sistema Nervioso Entérico

El sistema Nervioso Entérico (SNE) es la parte del Sistema Nervioso Autónomo (SNA) encargada de controlar los aspectos clave de la fisiología intestinal, como son el peristaltismo, la secreción del ácido gástrico, el flujo sanguíneo y el transporte de agua y electrolitos a través del epitelio mucoso [Furness, 2012]. El SNE está compuesto por una compleja red de células neuronales y gliales, la cual se organiza dando lugar a los ganglios entéricos (Figura 1A). Estos ganglios se distribuyen de manera homogénea y concéntrica a lo largo de las paredes del tubo digestivo formando dos plexos interconectados entre sí, uno más externo, el plexo mientérico o de Auerbach, situado entre las capas musculares circular y longitudinal de todo el tracto gastro-intestinal, y el más interno, localizado en la submucosa del intestino delgado y grueso, llamado plexo submucoso o de Neissner (Figura 1B). En humanos, el SNE contiene unas 5×10^8 neuronas, clasificadas funcionalmente en más de 15 tipos, lo que conlleva que dichas neuronas entéricas tengan diferentes propiedades electrofisiológicas y generen una amplia gama de neurotransmisores, lo que refleja la complejidad presente en dicho sistema [Furness, 2006].

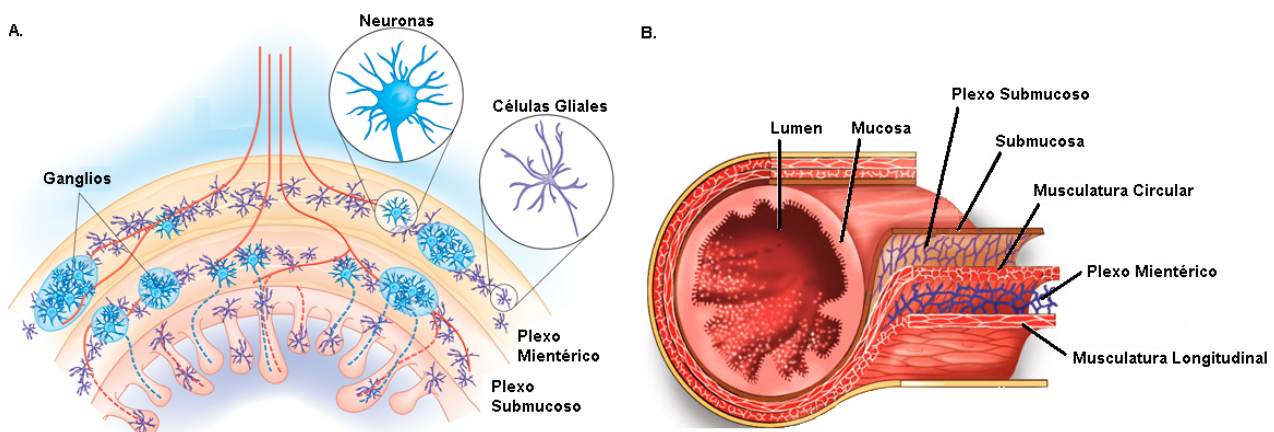


Figura 1A. Esquema del SNE donde se muestran los plexos entéricos y los tipos celulares presentes en los mismos [Adaptado de News y Highlights, 2008]. **1B.** Representación concéntrica de la disposición de los plexos entéricos con respecto a las distintas capas del intestino [Adaptado de Sadava y cols., 2007].

El SNE deriva de la cresta neural, una estructura transitoria que aparece en la unión de la placa neural con el ectodermo adyacente durante la formación del tubo neural en los primeros estadios del desarrollo. De dicha estructura surge una población de células con alta capacidad proliferativa y migratoria denominadas células de la cresta neural (CCN) [Yntema y Hammond, 1954] (Figura 2). Inicialmente la formación de la cresta neural surge del borde de la placa neural

por la expresión de un grupo de genes denominados "genes especificadores del borde de la placa neural" (BPN), entre los que se incluyen *Msx1/2*, *Pax3/7*, *Dlx5*, *AP2A*, *Gbx2* y *Zic1*. La expresión colectiva de estos genes confiere a esta región la capacidad para generar las CCN [Hu y cols., 2014a] (Figura 3).

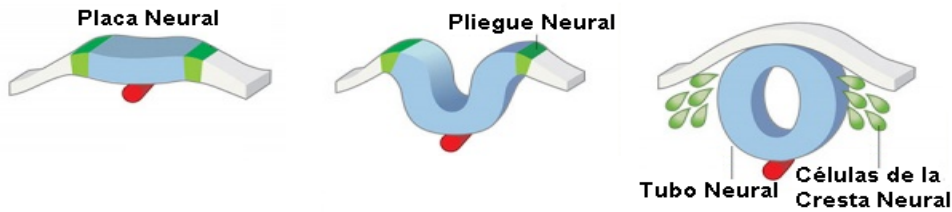


Figura 2. Diagrama que muestra las etapas de la aparición de las CCN a partir de la cresta neural. Las CCN se originan en los bordes de la placa neural, los cuales van convergiendo hasta fusionarse formando el tubo neural. En ese momento las CCN sufren una serie de cambios pasando de células epiteliales a mesenquimales, adquiriendo la capacidad migratoria que le permite abandonar el tubo neural para llegar a diferenciarse en el lugar de destino, proceso conocido como transición epitelio-mesénquima (TEM) [Adaptada de Green y cols., 2015].

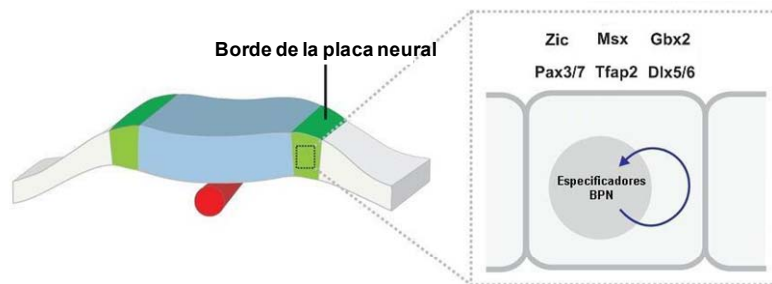


Figura 3. Esquema que muestra la especificación de la cresta neural a partir del borde la placa neural. Los genes BPN definen el territorio del borde de la placa neural que formará la cresta neural, activando a continuación los genes especificadores de la cresta neural [Adaptado de Simões-Costa y Bronner, 2015].

Posteriormente se activa un conjunto de genes denominados "genes especificadores de la cresta neural" cuya expresión no ocurre simultáneamente y donde se incluyen entre otros a *AP2*, *n-Myc*, *Id*, *Snail2*, *FoxD3*, *Ets-1* y *Sox8/9/10*. Estos genes regulan a su vez la expresión de otros genes implicados en el mantenimiento de la multipotencialidad y en el inicio de la Transición Epitelial-Mesenquimal (TEM) adquiriendo la capacidad migratoria, características esenciales que definen a las CCN. Dichas células durante la migración son guiadas a los tejidos diana mediante la interacción específica de una serie de receptores con sus ligandos. Tras la migración, la expresión de la mayoría de los genes especificadores de la cresta neural disminuye, aunque algunos de ellos, como *SOX10*, se mantienen en determinadas CCN, contribuyendo a la diferenciación de las mismas [Hu y cols., 2014a] (Figura 4).

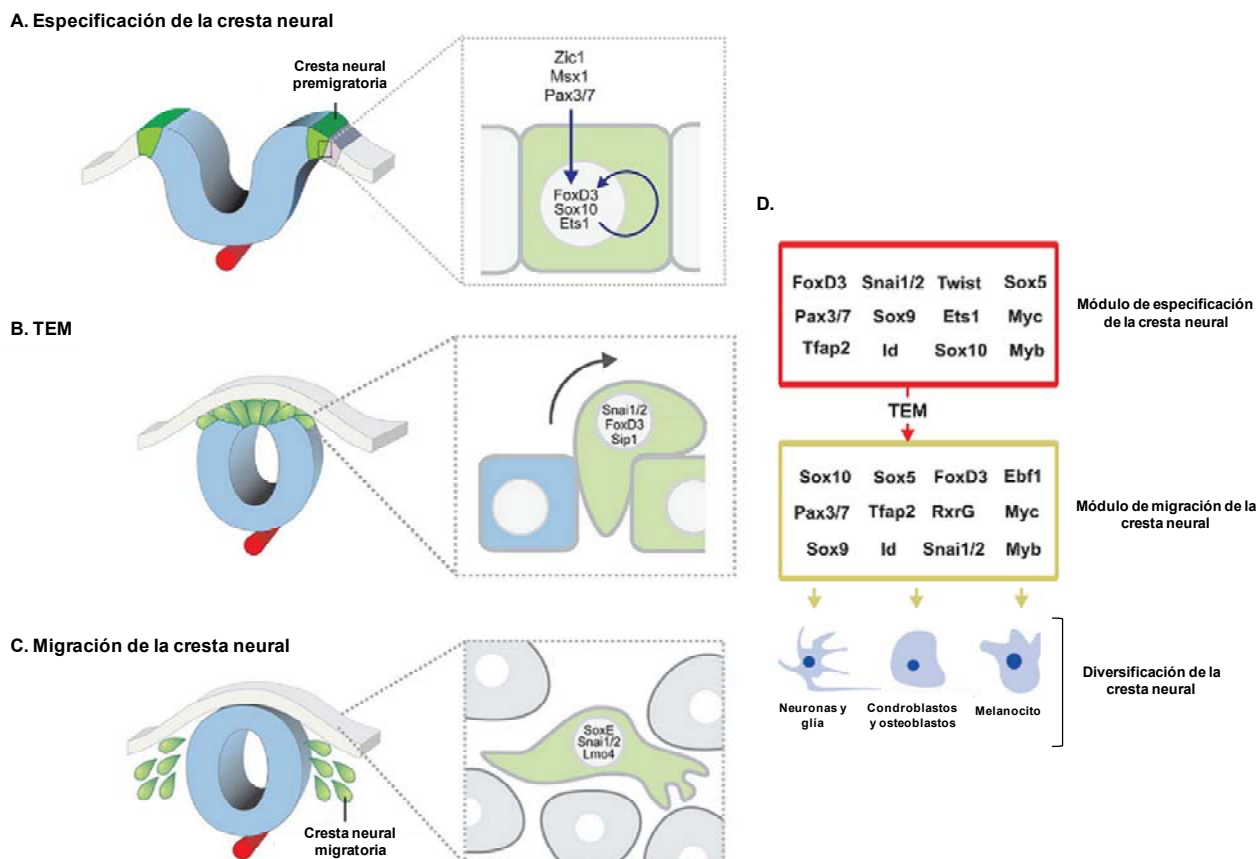


Figura 4. Etapas de la formación y migración de las CCN a partir de la cresta neural. 4A. Plegamiento de la placa neural y expresión de los genes especificadores de la cresta neural. 4B. Expresión de los genes del módulo responsable de la TEM de la cresta neural que permite la formación de las CCN. 4C. Expresión de los genes responsables de la migración de las CCN. 4D. Representación de los módulos con los genes implicados en cada etapa del proceso que deriva finalmente en la diferenciación celular. [Adaptado de Simões-Costa y Bronner, 2015].

Las CCN procedentes de las distintas regiones de la cresta neural junto con la acción específica de varias señales reguladoras, van a determinar la formación de los distintos tipos celulares para finalmente dar lugar a una variedad de estructuras, entre las que se encuentra el SNE [Mayor, 2013] (Figura 5). En concreto, la formación del SNE ocurre entre la séptima y duodécima semana de gestación [Okamoto y Ueda, 1967], siendo la región vagal la mayor fuente de CCN que van a generar a los precursores del SNE y la encargada de colonizar las regiones más distales. Las regiones troncal y sacra también contribuyen a la formación del SNE, pero su aportación es más reducida [Yntema y Hammond, 1954; Kapur, 2000] (Figura 6A). El modo de migración que presentan las CCN durante el desarrollo del SNE es mediante la formación de cadenas migratorias, donde el contacto entre células es esencial. Además, durante la migración de las CCN, dichas células van proliferando y diferenciándose progresivamente en neuronas y glía

para finalmente agruparse en ganglios y formar la compleja red a lo largo del intestino [Lake y Heuckeroth, 2013] (Figura 6B).

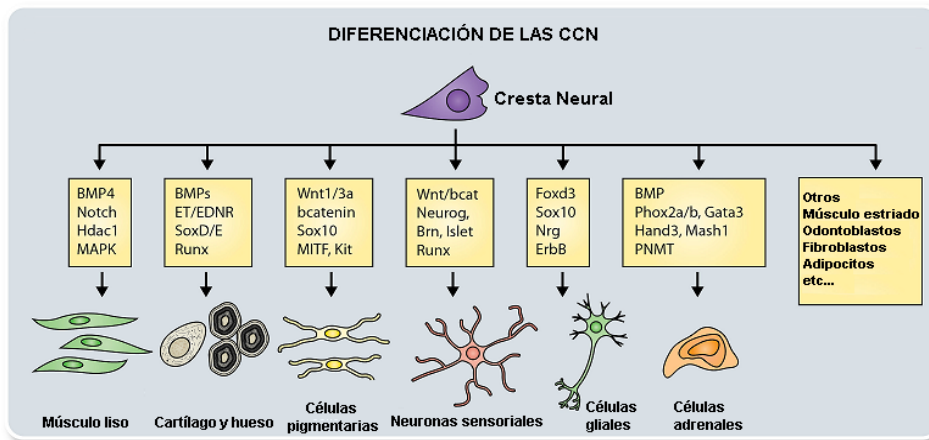


Figura 5. Esquema que representa los diferentes tipos celulares formados a partir de las CCN [Adaptada de Mayor, 2013].

Por tanto, las CCN responsables de la formación del SNE van a dar lugar a una población heterogénea y multipotente de células precursoras entéricas (CPEs) que presentan distintos grados de diferenciación y en algunos casos mantienen la capacidad de auto-renovación [Young y cols., 2005]. Estas CPEs proliferan, migran y colonizan el tracto gastrointestinal, donde posteriormente se diferencian a las distintas estirpes celulares presentes en el SNE maduro y funcional. Para ello existe una fina regulación mediada por numerosos factores de transcripción y vías de señalización, donde cualquier alteración puede dar lugar a fallos en este complejo proceso [Le Douarin y cols., 1992; Henion y Weston, 1997; Newgreen y Young, 2002a; Newgreen y Young, 2002b; Binder y cols., 2008]. En este sentido, en los últimos años están aumentando las evidencias que apoyan un importante papel de la regulación epigenética en el desarrollo del SNE, principalmente en el control de la expresión génica en los diferentes estadios [Hu y cols., 2014a; Torroglosa y cols., 2016]. Por tanto, profundizar en la investigación de los mecanismos de regulación implicados en el desarrollo de la cresta neural en un contexto epigenético, permitiría ampliar el conocimiento sobre la etiopatogenia de las neurocristopatías, como es la enfermedad de Hirschsprung (HSCR).

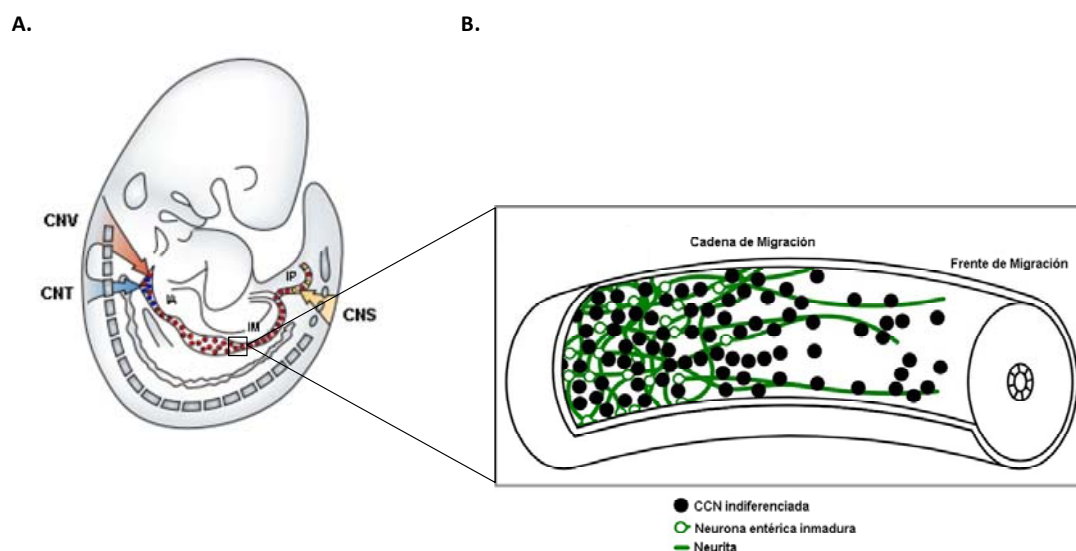


Figura 6A. Formación del SNE. Las células de la cresta neural vagal (CNV) invaden el intestino anterior (IA) y migran en dirección rostro-caudal colonizando el intestino medio (IM) y el intestino posterior (IP), dando lugar a la mayor parte del SNE. Las células de la cresta neural troncal (CNT) colonizan el esófago y el estómago anterior. Por último, las células de la cresta neural sacra (CNS) migran en dirección caudal-rostral colonizando el colon [Adaptado de Heanue y Pachnis, 2007]. **6B. Diagrama de la cadena migratoria de las CCN.** Las CCN migran en cadenas frecuentemente asociadas a las neuritas proyectadas caudalmente de neuronas inmaduras [Adaptada de Lake y Heuckeroth, 2013].

1.1.1 Principales rutas de señalización y factores implicados en el desarrollo del SNE

El desarrollo del SNE es un proceso complejo en el que numerosos genes están implicados. Estos genes codifican para receptores, ligandos, factores de transcripción y otros elementos celulares involucrados en el desarrollo de las CPEs, siendo algunas de estas moléculas los participantes de importantes rutas de señalización, como la ruta de RET, Hedgehog/Notch, EDNRB, NTF-3/TRKC, PROKs, NRG y SEMAs. Otros genes importantes para dicho proceso son *SOX10*, *STAT3*, *PHOX2B*, *ZFHX1B*, *KIAA1279*, *L1CAM*, *PAX3*, *MASH1*, *HOX11L.1* y *HAND2* [Nichane y cols., 2010; Borrego y cols., 2013; Lake y Heuckeroth, 2013; Liu y Ngan, 2014].

1.1.1.1 Ruta de señalización RET

La ruta de señalización de RET es la ruta más conocida del desarrollo del SNE. El proto-oncogén RET codifica para un receptor transmembrana con actividad tirosín-kinasa, el cual está implicado en la activación de importantes cascadas de señalización intracelular que regulan proliferación, diferenciación y supervivencia celular. Presenta tres dominios, uno extracelular, presentando una región con alta homología a la familia de las moléculas de adhesión intercelular cadherinas y una región rica en cisteínas, uno transmembrana y otro intracelular, siendo este

último el que presenta el dominio con actividad catalítica tirosín-kinasa [Takahashi y cols., 1988]. En el extremo carboxi-terminal, hay una cola específica para cada isoforma de RET con distinta afinidad de unión a las distintas moléculas adaptadoras [Tsu-Pierchala y cols., 2002] (Figura 7A).

RET se expresa en las CCN y el papel en estas células es promover su supervivencia, proliferación, migración, diferenciación y crecimiento de neuritas [Lake y Heuckeroth, 2013]. La activación de RET requiere la formación de un complejo multimérico, en el que participa un ligando de la familia de factores neurotróficos derivados de la glía (*Glial Derived Neurotrophic Factors*, GDNF), y un coreceptor de la familia de receptores α de GDNF (GFR α). Se han identificado cuatro ligandos (*Glial Derived Neurotrophic Factors*, GDNF; *neurturin*, NRTN; *artemin*, ARTN y *persephin*, PSPN) y cuatro co-receptores (GFR α 1, GFR α 2, GFR α 3 y GFR α 4), existiendo una afinidad preferencial de cada ligando por un co-receptor GFR α concreto. Así, GDNF se une preferencialmente a GFR α 1, NRTN a GFR α 2, ARTN a GFR α 3 y PSPN a GFR α 4, aunque otras uniones de menor afinidad son posibles, como la unión de NRTN y ARTN a GFR α 1, GDNF a GFR α 2 y GFR α 3 y PSPN a GFR α 1 [Lin y cols., 1993; Baloh y cols., 1998; Sidorova y cols., 2010]. Los ligandos de RET son homodiméricos y la unión se produce con dos moléculas de GFR α , interaccionando este complejo con dos moléculas de RET, lo que induce la dimerización y autofosforilación de los residuos tirosínicos del dominio intracelular y desencadena la activación de diversas rutas de señalización [Airaksinen y cols., 1999; Treanor y cols., 1996; Jing y cols., 1996; Runeberg-Roos y Saarma, 2007] (Figura 7B). Estas rutas son RAS-MAPK, PI3K-AKT, JNK y PLC- γ [Lois, 2014] (Figura 8). La vía RAS-MAPK está implicada en los procesos biológicos de proliferación y diferenciación celular [Boguski y McCormick, 1993], y la vía PI3K-AKT principalmente en la migración de las CCN [Natarajan y cols., 2002], aunque también juega un importante papel en la supervivencia y proliferación celular (Yu y Cui, 2016).

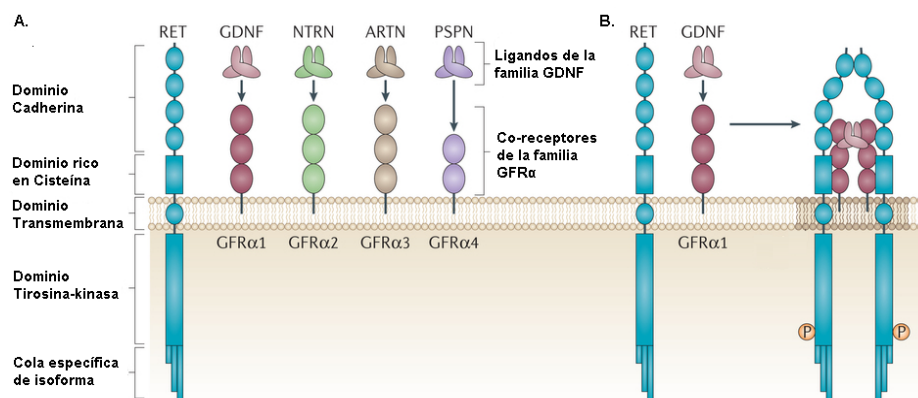


Figura 7A. Esquema de los distintos dominios de RET e interacciones de los ligandos, co-receptores GFR α y RET. 7B. Mecanismo de activación de RET [Adaptada de Lois, 2014].

Cabe destacar que el co-receptor GFR α 1 y el ligando GDNF son elementos esenciales para la activación de RET durante el desarrollo embrionario, ya que los ratones con mutaciones de pérdida de función de *Gdnf* y *Gfra1* muestran aganglionosis, un fenotipo similar al mostrado por ratones con pérdida de función de *Ret* [Lake y Heuckeroth, 2013]. En cambio, cuando la mutación está en *Nrtn* o *Gfra2*, este fenotipo tan severo no aparece, aunque da lugar a una menor densidad de neuronas colinérgicas del SNE [Heuckeroth y cols., 1999; Rossi y cols., 1999]. En cuanto a la función de GDNF en el desarrollo del SNE, se ha descrito su papel regulador en la migración de las CCN, ya que su gradiente de expresión guía a la ola migratoria hacia el intestino en formación. Por otro lado, GDNF también actúa como mitogénico sobre las CPEs y promueve su diferenciación a neuronas entéricas [Lake y Heuckeroth, 2013].

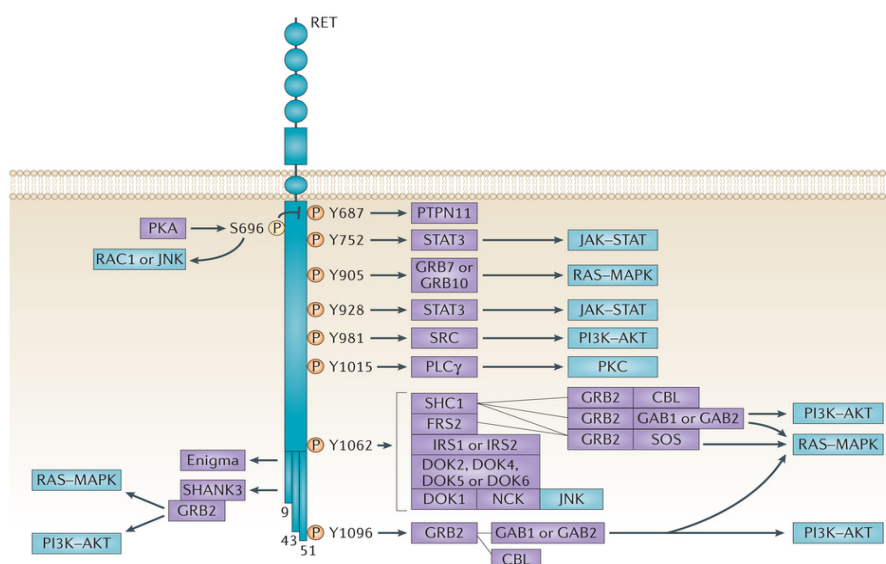


Figura 8. Cascada de activación de vías de señalización mediada por la actividad de RET. Se muestra la interacción de los residuos tirosina fosforilados con las diferentes proteínas adaptadoras, lo que permite la activación de múltiples vías de señalización [Lois, 2014].

1.1.1.2 Ruta de señalización Hedgehog y Notch

Las rutas de señalización Hedgehog (Hh) y Notch son esenciales en el desarrollo del SNE al coordinar la proliferación, la diferenciación neuronal y la transición de la neurogénesis a la gliogénesis, todos ellos son procesos celulares necesarios para la correcta formación del SNE. Para ello, dichas vías de señalización pueden actuar individual o cooperativamente [Liu y Ngan, 2014].

La ruta de señalización Hh actúa como morfógeno en el intestino en desarrollo,

estableciendo un gradiente de expresión de los genes componentes de dicha ruta a lo largo del intestino en formación, lo que es determinante para la correcta formación del mismo. Uno de estos genes es Sonic hedgehog (*Shh*), cuyo gradiente de expresión en el tubo neural es esencial para el patrón radial del SNE, ya que diferentes concentraciones inducen la formación de diferentes tipos celulares [Ramalho-Santos y cols., 2000; Liu y Ngan, 2014]. SHH regula la formación de los plexos entéricos al inducir la proliferación, inhibir la diferenciación y restringir la migración inducida por GDNF de las CPEs, siendo el balance de GDNF y SHH esencial para la correcta formación de dichos plexos [Fu y cols., 2004]. Por otro lado, mutaciones en *Shh* y en indian hedgehog (*Ihh*) han mostrado su posible papel en las malformaciones gastrointestinales humanas. El genotipo *Shh*^{-/-} produce excesivas neuronas entéricas, además de su incorrecta ubicación en el tracto gastrointestinal. Por el contrario, el genotipo *Ihh*^{-/-} causa la ausencia total de neuronas en una porción del intestino delgado y colon, un fenotipo muy similar al mostrado por los pacientes HSCR [Ramalho-Santos y cols., 2000]. Otro papel de la vía de señalización Hh en el desarrollo del SNE es llevado a cabo de manera indirecta al inducir al mesénquima intestinal a secretar *Bowel mesenchyme to secrete bone morphogenetic protein 4* (BMP4), otro importante modulador de la formación del SNE que estimula la agregación neuronal dando lugar a la formación de los ganglios entéricos [Lake y Heuckeroth, 2013].

La ruta de señalización Notch también es importante para el desarrollo embrionario, ya que deleciones en varios genes pertenecientes a esta ruta provocan la muerte embrionaria en el ratón. Concretamente, el gen *Notch* se expresa en las CCN y está implicado en la migración de dichas células, ya que defectos en la señalización de Notch reduce el número de CPEs en el intestino al interrumpirse sus rutas migratorias durante la formación del SNE. Esta ruta también está implicada en la diferenciación de las CCN al inhibir la neurogénesis y promover la gliogénesis, función que realiza, en parte, al regular la expresión de *Sox10* [Liu y Ngan, 2014].

1.1.1.3 Factor de transcripción SOX10

Existen numerosos factores de transcripción implicados en el desarrollo del SNE, debido en parte por su papel regulador en la expresión de *RET*. Entre ellos, uno de los más importantes es *SOX10* (*Sex determinig region Y box 10*), el cual codifica para una proteína que pertenece a la familia de los factores de transcripción SOX. *SOX10* se expresa en el tubo neural, en las CCN migratorias y en la glía entérica madura [Lake y Heuckeroth, 2013]. La haploinsuficiencia o pérdida completa de *Sox10* provoca la apoptosis de las CCN entéricas, lo que reduce el número de dichas células que colonizan el intestino, resultando en una aganglionosis. Además de su implicación en la

supervivencia celular, SOX10 está relacionado con el mantenimiento de las CCN en un estado indiferenciado y con la inhibición de su diferenciación en neuronas, favoreciendo la generación de glía [Kapur, 1999; Kim y cols., 2003; Bondurand y cols., 2006; Lake y Heuckeroth, 2013] (Figura 9).

SOX10, junto a otros miembros de la familia, como *SOX8* y *SOX9*, actúan como genes especificadores de la cresta neural, cuya expresión es necesaria para la regulación de genes que aportan a las CCN las capacidades de migración y multipotencia características de estas células. Tras la migración, sólo *SOX10* mantiene su expresión para contribuir a la diferenciación de las CCN [Hu y cols., 2014a]. *SOX10* actúa uniéndose a las regiones promotoras de sus genes diana individualmente o en combinación con otros factores de transcripción, como es el caso de la interacción de *SOX10* y *PAX3*, la cual da lugar a un aumento de la actividad transcripcional de *RET* [Lang y Epstein, 2003].

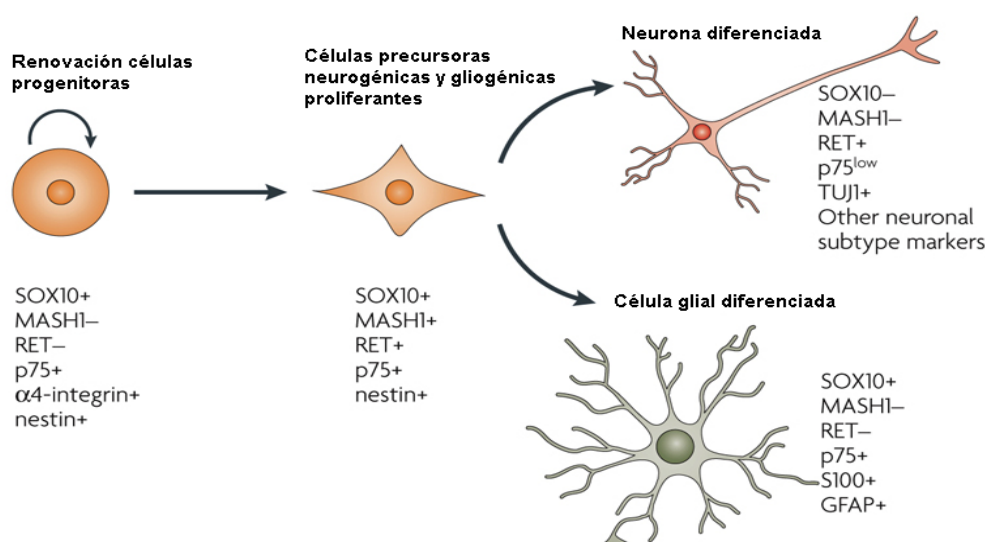


Figura 9. Diferenciación de las células precursoras neurales entéricas. Las células precursoras con capacidad de autorrenovarse expresan *SOX10*, *P75*, $\alpha 4$ -integrin y *nestin*. Las células precursoras ya comprometidas a neuronas o glía expresan *RET* y *MASH1*. Finalmente, las células diferenciadas a glía mantienen la expresión de *SOX10* [Adaptada de Heanue y Pachnis, 2007].

1.1.1.4 Factor de transcripción STAT3

El factor de transcripción STAT3 es una de las principales proteínas adaptadoras activada por *RET* [Schuringa y cols., 2001]. STAT3 es un transductor de señal y activador de la transcripción que modula la transcripción de genes para regular importantes funciones biológicas. La fosforilación del residuo tirosina 705 de STAT3 permite su homodimerización, translocación al

núcleo e inducción de la transcripción de sus genes diana por unión a secuencias de ADN específicas [Kim y cols., 2016]. Su actividad coordina la progresión del ciclo celular y la especificación de la cresta neural durante el desarrollo, ya que una alta actividad de STAT3 mantiene en un estado indiferenciado y no especificado a las potenciales CCN, pero una baja actividad promueve la proliferación de dichas células y la expresión de marcadores de la cresta neural [Nichane y cols., 2010].

1.1.2 Regulación epigenética durante el desarrollo del SNE

Aunque los eventos regulatorios implicados en el desarrollo de la cresta neural más estudiados son los mediados por factores de transcripción y moléculas de señalización, en los últimos años, los mecanismos mediados por la epigenética han ido adquiriendo importancia dentro del desarrollo del SNE [Torroglosa y cols., 2016]. Las modificaciones epigenéticas se definen como mecanismos que regulan la expresión génica sin alterar la secuencia de ADN [Bernstein y cols., 2007]. Principalmente, los cambios epigenéticos se clasifican en tres niveles: 1) Modificaciones a nivel de nucleótidos (ARN interferente (ARNi) y metilación del ADN); 2) Modificaciones a nivel de histonas (metilación, acetilación y fosforilación); 3) Remodelación a nivel de nucleosoma (Figura 10). Todas estas modificaciones determinan la actividad transcripcional del genoma al activar o reprimir la expresión génica debido a la relajación o compactación de la cromatina, lo que permite o impide el acceso a los factores de transcripción al ADN, respectivamente [Hu y cols., 2014a].

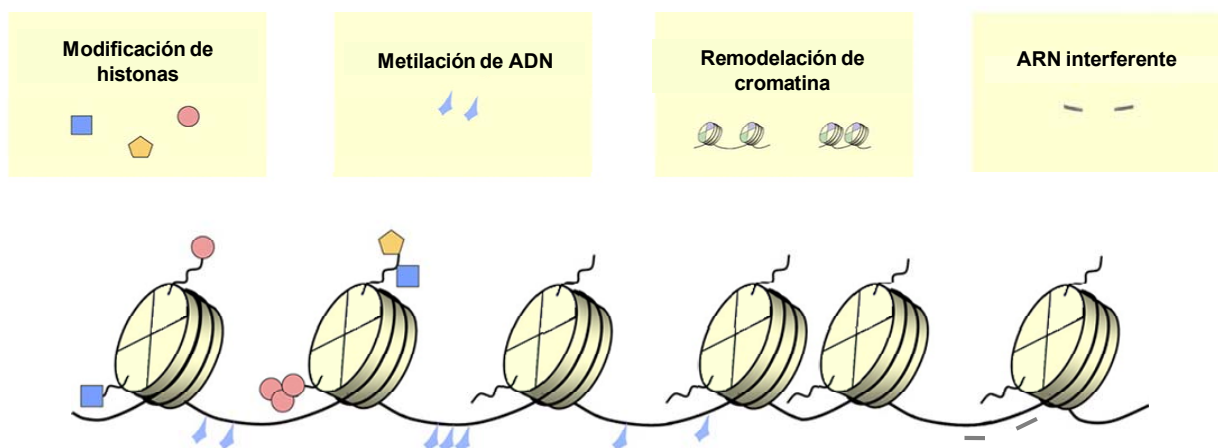


Figura 10. Esquema que muestra algunas de las modificaciones epigenéticas en la molécula de ADN. Todos los tipos de modificaciones epigenéticas regulan la accesibilidad de la maquinaria de transcripción a la cromatina [Adaptada de Gräff y cols., 2010].

1.1.2.1 Metilación del ADN

La metilación del ADN es el primer mecanismo epigenético descrito en eucariotas. Perturbaciones en este proceso provocan alteraciones en la transcripción que pueden provocar situaciones fisiopatológicas, sobre todo relacionadas con defectos en el desarrollo y con procesos neoplásicos [Jones y cols., 1983]. Este mecanismo epigenético consiste en la adición de un grupo metilo al residuo de citosina que se encuentra en la quinta posición (5 metilcitosina o 5mC). Este proceso es llevado a cabo por un grupo de enzimas llamadas ADN metiltransferasas (DNMTs), las cuales establecen un patrón de metilación específico para cada célula y tejido (Figura 11A). Los residuos de citosina susceptibles a metilación están principalmente formando dinucleótidos CG, aunque la metilación fuera del contexto CG ha sido observada en células madre embrionarias. Se estima que aproximadamente el 70-80% de estos dinucleótidos CG están metilados a lo largo del genoma. Las regiones de al menos 200 pb con una alta concentración de dinucleótidos CG se denominan islas CpG (Figura 11B). Estas regiones se encuentran principalmente en las regiones promotoras, estando presentes en aproximadamente 2/3 de los genes en mamíferos, aunque también pueden estar localizadas intra e intergénicamente [Law y Jacobsen, 2010; Walton y cols., 2014].

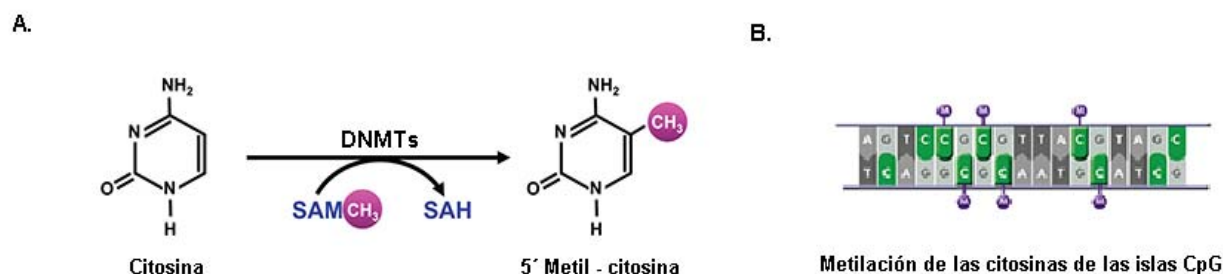


Figura 11A. Reacción de metilación del ADN. Transferencia de un grupo metilo de la S-adenosyl-l-metionina (SAM) a la posición 5 de la citosina por la actividad de DNMTs, lo que libera la S-adenosyl-l-homocisteina (SAH). **11B. Representación de la metilación del ADN en las islas CpG** [Adaptada de Zakhari, 2013].

La presencia de la 5mC se asocia con el silenciamiento de la expresión génica, jugando además un importante papel en varios procesos del desarrollo, como la inactivación del cromosoma X o la impronta genómica. El radical metilo de la 5mC reside en el surco mayor de la hélice de ADN donde interaccionan muchas proteínas de unión. Por tanto, la metilación tiene el papel de permitir o impedir la unión al ADN de proteínas reguladoras de la expresión génica. En relación a lo expuesto, existe una familia de proteínas conocidas como *methyl-CpG binding domain*

proteins (MBDs), que se unen a los dinucleótidos CG metilados presentes en el ADN. Estas proteínas reclutan complejos represores que inhiben la expresión génica a través de mecanismos que hacen a los promotores inaccesibles para la maquinaria transcripcional. De otro modo, regiones CpG metiladas interfieren en la unión de factores de transcripción, lo que también impide la transcripción de genes específicos [Li y cols., 2014].

En mamíferos, el patrón inicial de metilación es llevado a cabo por las *de novo* metiltransferasas (DNMT3a y DNMT3b) durante el desarrollo embrionario [Cheng y Blumenthal, 2008]. Esta metilación *de novo* es frecuente en regiones inter e intragénicas, aunque también ocurre en los promotores de los genes [Borgel y cols., 2010]. La actividad de estas enzimas puede ser modulada por DNMT3L, un miembro catalíticamente inactivo [Wienholz y cols., 2010]. Este patrón de metilación es mantenido tras la replicación del ADN por la metiltransferasa de mantenimiento (DNMT1). En cada ronda de replicación, se produce ADN hemimetilado, donde sólo la cadena parental presenta las marcas de metilación. Posteriormente, la cadena hija es metilada con respecto al patrón de la cadena parental por DNMT1 [Law y Jacobsen, 2010]. Cuando la actividad de DNMT1 es suprimida durante la división celular, se da lugar a la desmetilación pasiva del ADN, lo que resulta en un 50% menos de ADN metilado en cada ronda de replicación. También dicha desmetilación puede ocurrir mediante la actividad enzimática de las proteínas *Ten-Eleven Translocation* (Tet) (Figura 12) [Jurkowska y cols., 2011]. El patrón de metilación puede ser transmitido de célula a célula, aunque éste no es permanente. De hecho, ocurren cambios en los patrones de metilación del ADN a lo largo de la vida de un individuo, siendo algunos de ellos en respuesta a cambios ambientales, mientras que otros se asocian a procesos patológicos, como la transformación oncogénica o el envejecimiento celular. [Li y cols., 2014].

Por otro lado, se ha mostrado la relación de la metilación con el control de la pluripotencia, ya que genes relacionados con la pluripotencialidad celular tienen una mayor susceptibilidad para ser metilados y su desmetilación es necesaria para la reprogramación y readquisición de la pluripotencia en células somáticas [Mayer y cols., 2000]. La relevancia clínica de la metilación del ADN apareció con el cáncer, donde reducidos niveles de metilación permiten la supresión de algunas formas de tumores en ratón a través de la manipulación genética o el tratamiento con inhibidores de ADN metiltransferasas. Inversamente, la hipometilación en el ADN también puede favorecer la formación de ciertos tipos de tumores. Otras enfermedades humanas han sido relacionadas con mutaciones en genes que codifican para componentes esenciales de la maquinaria de metilación del ADN, como el caso del síndrome de inmunodeficiencia, inestabilidad de la

región centromérica y anomalías faciales (ICF), provocado por mutaciones en *Dnmt3b*, o el síndrome Rett, un desorden neurológico severo provocado por mutaciones en *MeCP2*, una MBD [Li y cols., 2014]. Por tanto, parece que la integridad de la maquinaria de metilación del ADN es crucial para el correcto desarrollo en mamíferos, por lo que el estudio de estos mecanismos en enfermedades humanas podría contribuir al esclarecimiento del impacto en la salud humana de las modificaciones epigenéticas.

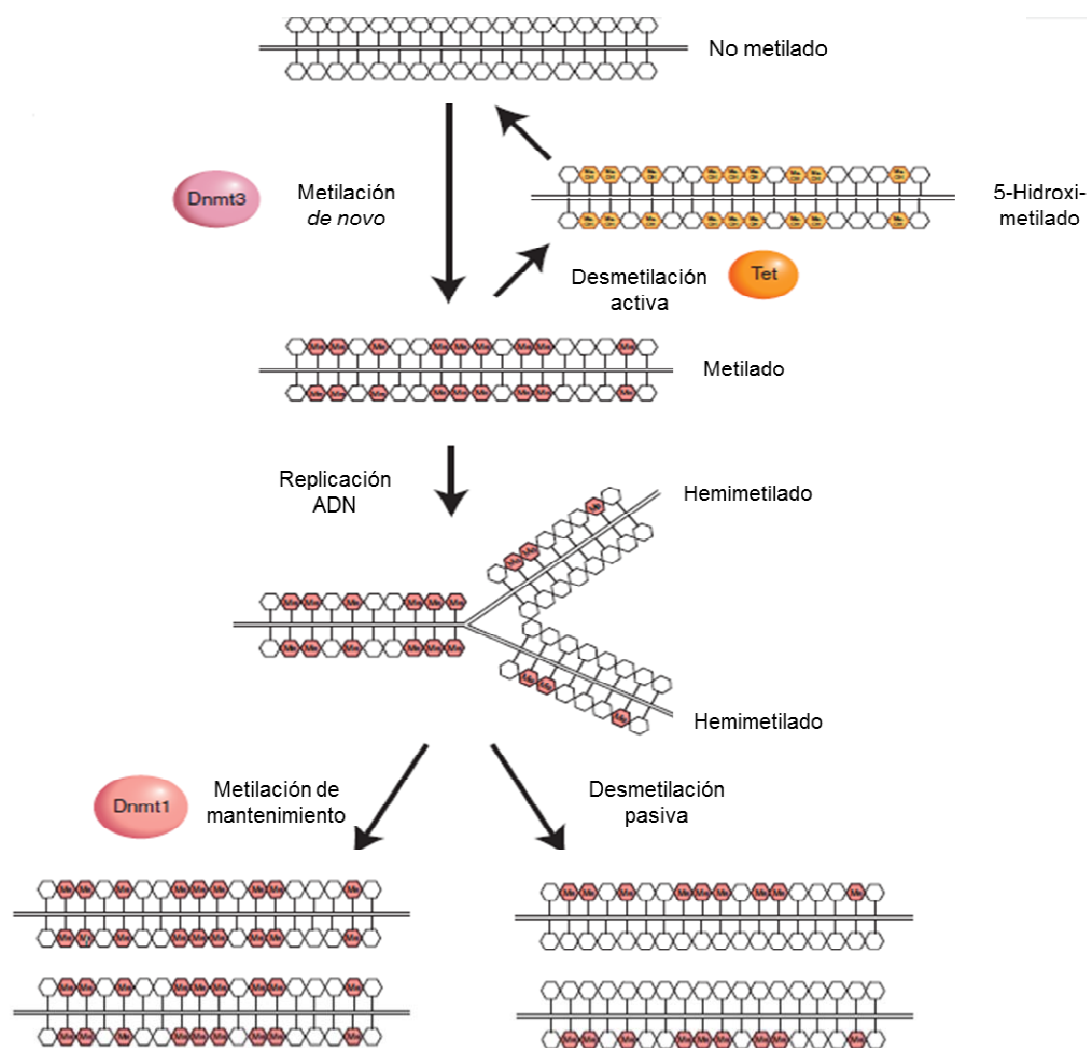


Figura 12. Metilación *de novo* y de mantenimiento del ADN. El ADN es metilado *de novo* por DNMT3a y DNMT3b. En la replicación semiconservativa del ADN, la cadena hija es metilada por DNMT1 restaurando la simetría entre ambas cadenas [Adaptada de Li y cols., 2014].

1.1.2.1.1 Metilación *de novo* durante el desarrollo embrionario

La metilación del ADN experimenta cambios dinámicos a lo largo del desarrollo embrionario. Tras la fecundación, se produce la desmetilación de todo el genoma, para posteriormente en la etapa de implantación tener lugar la metilación *de novo* del ADN mediada por DNMT3a y DNMT3b. Se ha descrito que la inactivación conjunta de ambas *de novo* metiltransferasas en el ratón provoca la muerte del embrión en los estadios iniciales, evidenciando la importancia de dicha metilación durante el desarrollo. Por otro lado, la inactivación de la expresión de ambos genes por separado tiene diferentes consecuencias en el embrión, lo que indica distintas funciones para cada una de estas proteínas durante el desarrollo. Así, mutantes knockout de *Dnmt3a* mueren a las pocas semanas del nacimiento, sin embargo, en los mutantes para *Dnmt3b*, la muerte se produce en la etapa embrionaria y muestran además defectos a nivel del tubo neural, entre otros [Okano y cols., 1999]. Acorde con esto, el patrón de expresión de dichas *de novo* metiltransferasas también indican que *Dnmt3b* tiene una importante función durante el desarrollo temprano, mientras que *Dnmt3a* actúa principalmente durante el desarrollo tardío o tras el nacimiento [Okano y cols., 1999; Borgel y cols., 2010]. En la misma línea, una menor expresión de *Dnmt3b* en embriones de ratón causa un aumento aberrante de la expresión de numerosos genes en sus células somáticas, estando la mayoría de estos genes expresados normalmente en líneas germinales. Asimismo, la hipometilación en los promotores de estos genes propios de células germinales correlaciona con su inapropiada expresión en tejidos somáticos, por lo que parece que la metilación del ADN ejerce la represión transcripcional de dichos genes en las células somáticas [Borgel y cols., 2010; Walton y cols., 2014]. Todos estos datos indican que DNMT3b cataliza la metilación *de novo* durante la embriogénesis temprana, y esto da lugar a una fina regulación de la expresión de genes específicos durante los primeros estadios del desarrollo embrionario.

1.1.2.1.2 Metilación *de novo* en el desarrollo de la cresta neural

La metilación *de novo* también es necesaria para el correcto desarrollo de la cresta neural. En este sentido, la *de novo* metiltransferasa *Dnmt3a* se expresa en la cresta neural de embriones de pollo. La pérdida de su expresión provoca un aumento en la expresión de los genes neurales *Sox2* y *Sox3* y una bajada de la expresión de los genes especificadores de la cresta neural *Sox10*, *Snail2*, *FoxD3*. Esto indica que *Dnmt3a* media la transición del tubo neural a cresta neural a través de la represión de dichos genes especificadores neurales y la activación de la expresión de los genes especificadores de la cresta neural [Hu y cols., 2012].

Varios estudios han mostrado el importante papel que también juega DNMT3b en el desarrollo de la cresta neural. Por un lado, DNMT3b es de particular interés por su papel en el desarrollo mediante la regulación de la expresión génica. En este aspecto, en embriones de pollo, DNMT3b inhibe la transcripción de *Sox10* mediante la metilación de su región promotora en los progenitores del tubo neural dorsal, lo que provoca la pérdida de su capacidad para producir CCN migratorias finalizando el proceso de la TEM. Por tanto, DNMT3b controla espaciotemporalmente la TEM en las CCN craneales mediante la represión de *Sox10* [Hu y cols., 2014b]. Asimismo, en células embrionarias humanas la bajada de expresión de *DNMT3b* parece que acelera la diferenciación de los precursores de la cresta neural, ya que provoca la expresión temprana de marcadores de neuronas maduras (*NEUROD1*) y de genes especificadores de la cresta neural (*PAX3*, *PAX7*, *SNAIL2*, *FOXD3*) [Martins-Taylor y cols., 2012]. Embriones de pez cebra deficientes para *Dnmt3b*, muestran una neurogénesis reducida y defectos en estructuras craneofaciales [Rai y cols., 2010]. Todas estas evidencias muestran un papel esencial de DNMT3b en el desarrollo de la cresta neural, donde parece estar involucrado en la regulación de la TEM y del momento de la diferenciación neuronal durante el desarrollo embrionario.

Por otro lado, la importancia de DNMT3b durante el desarrollo también reside en el hecho de su función en el establecimiento del patrón de metilación [Scarano y cols., 2005]. La deficiencia de DNMT3b en células embrionarias humanas causa un descenso de metilación en regiones pericentroméricas y a lo largo del cromosoma X [Martins-Taylor y cols., 2012]. Además, aberrantes patrones de metilación están asociados con varias enfermedades humanas [Scarano y cols., 2005]. En este aspecto, mutaciones en *DNMT3b* han sido detectadas en varias líneas celulares de cáncer, causando la alteración del patrón de metilación, lo que resulta en un anormal patrón de la expresión génica [Walton y cols., 2014]. De manera similar, mutaciones en *DNMT3b* causan el síndrome ICF, el cual manifiesta disfunciones neurológicas, entre otros síntomas relacionados con el desarrollo anormal de la cresta neural [Ehrlich y cols., 2008; Jin y cols., 2008]. Teniendo esto en cuenta, parece que el establecimiento de los patrones correctos de metilación es esencial para el desarrollo embrionario, y la pérdida o cambios de estos patrones causan varias enfermedades humanas. Por tanto, la identificación de las dianas de las *de novo* metiltransferasas es crucial para el entendimiento del desarrollo normal y de la aparición de determinadas patologías.

1.1.2.2 Otros mecanismos epigenéticos en el desarrollo de la cresta neural

El complejo represivo polycomb (PRC) y la metilación del ADN son sistemas epigenéticos esenciales principalmente para el establecimiento y mantenimiento del silenciamiento de la

expresión génica. Ambos sistemas de represión epigenética están relacionados entre sí directamente a través de la proteína del grupo polycomb EZH2 y las *de novo* metiltransferasas [Viré y cols., 2006; Martins-Taylor y cols., 2012]. PRC está compuesto por un grupo de proteínas que silencian epigenéticamente la transcripción de sus genes diana a través de la trimetilación del complejo histona 3 lisina 27 (H3K27me3) (Figura 13A), lo que está frecuentemente asociado con la conformación de la cromatina [Schuettengruber y cols., 2007; Lanzuolo y Orlando, 2012]. Existen principalmente dos complejos, PRC1 y PRC2, que se encargan de iniciar y mantener la represión de la cromatina respectivamente (Figura 13B).

En concreto, el complejo central de PRC2 está formado por las subunidades EED, SUZ12 y EZH2, siendo ésta última la que cataliza la adición de grupos metilo a la H3K27, aunque para formar un complejo catalíticamente activo se requiere de las otras subunidades. Cabe mencionar que las tres subunidades se expresan en las CCN y son necesarias para la expresión de los marcadores de la cresta neural. Su patrón de expresión sugiere que los tres genes que codifican para dichas subunidades trabajan conjuntamente para regular el desarrollo de la cresta neural [Tien y cols., 2015]. Al complejo central de PRC2 se asocian varias proteínas adicionales (RBBP4/7, JARID2, AEBP2, PCL1-3, C17orf96, y C10orf12) [Smits y cols., 2013], lo que determina las diferentes interacciones con sus genes diana y la regulación de la actividad de dicho complejo [Di Croce y Helin 2013]. Se ha demostrado que PRC2 junto con el factor de transcripción SNAIL/SLUG regula el desarrollo de la cresta neural. La bajada de expresión de la subunidad catalítica EZH2 provoca defectos en la migración y especificación de la cresta neural, así como en la formación del cartílago craneofacial [Tien y cols., 2015]. Además, otro de los componentes de PRC2, en concreto EED (*Embryonic ectoderm development*), se une a YY1, un factor de transcripción implicado en la regulación del desarrollo de dicha estructura [Satijn y cols., 2001; Morgan y cols., 2004].

AEBP2 es un cofactor asociado estrechamente con PRC2 con capacidad de unión al ADN, por lo que es uno de los componentes responsables de las asociaciones de PRC2 al ADN [Kim y cols., 2009]. Dicho cofactor se expresa en las CCN y tiene como genes diana a algunos miembros pertenecientes a las rutas de señalización RET y EDNRB. Además mutantes heterocigotos para *Aebp2* tienden a presentar un conjunto de defectos similares (megacolon, defectos auditivos e hipopigmentación) a los provocados por fallos en el desarrollo de las CCN en humanos [Kim y cols., 2011]. Concretamente, parece que AEBP2 regula la migración de las CCN durante el desarrollo [Kim y cols., 2015]. Por tanto, según lo expuesto anteriormente, parece que el complejo PRC2 coopera con varios factores con el objetivo de controlar el programa de transcripción de la

cresta neural para su correcto desarrollo.

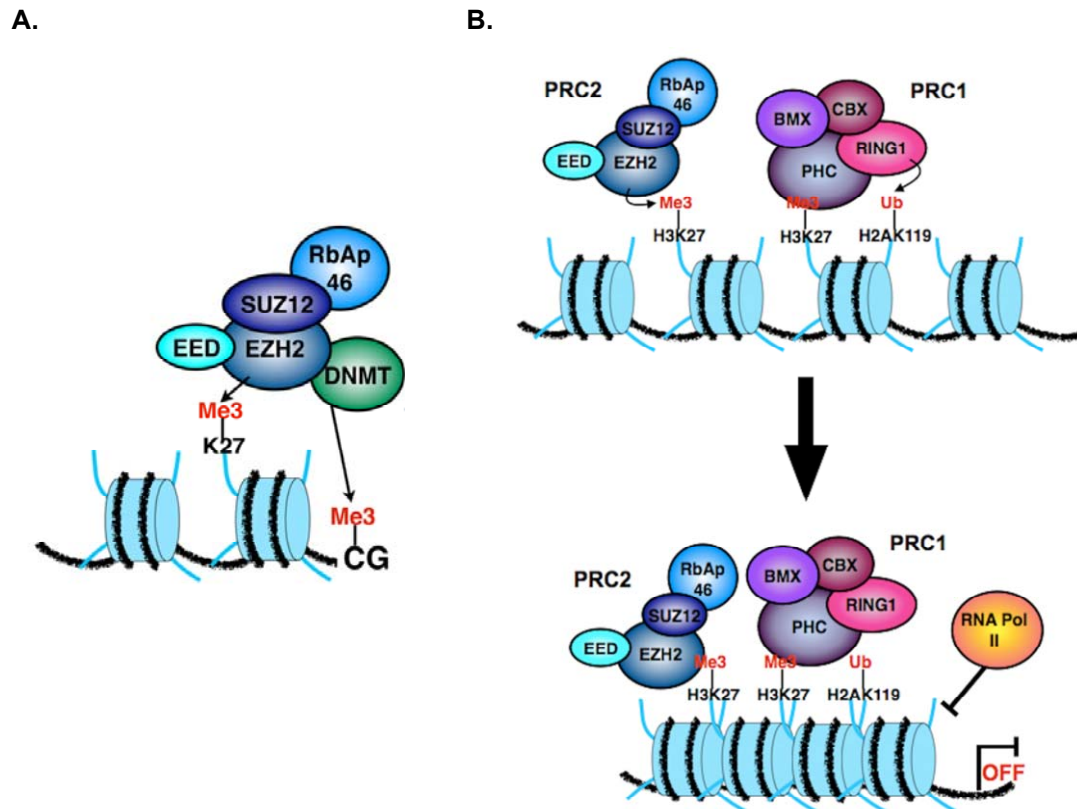


Figura 13. Silenciamiento transcripcional mediado por los complejos PRC. 13A. PRC2 silencia a sus genes diana a través de H3K27me3. PRC2 también puede reclutar a DNMTs que metilan el ADN para promover un estado silenciado de la cromatina más estable. 13B. PRC2 induce la H3K27me3 mediada por EZH2. H3K27me3 recluta a PRC1 que ubiquitina a H2AK119 promoviendo la compactación de la cromatina y el silenciamiento de genes [Adaptada de Marchesi y Bagella., 2013].

1.2 Neurocristopatías

La cresta neural, como se comentó anteriormente, es una estructura transitoria y pluripotente cuya progenie, las CCN, dan lugar a distintos tipos celulares que formarán diferentes tejidos. Neurocristopatía es un término usado para referirse a aquellas enfermedades que derivan de un defecto en los procesos de proliferación, diferenciación y/o migración de las CCN. La diversidad de estas enfermedades es amplia, ya que las CCN dan lugar a una importante variedad de estructuras y los fallos en su desarrollo pueden ser múltiples y variados. Estos fallos pueden manifestarse de forma aislada o junto a síndromes y pueden ser desde tumores hasta malformaciones y anomalías aisladas o multifocales. Algunos ejemplos de neurocristopatías son síndrome de neoplasia múltiple 2 (MEN2), neuroblastoma (NB), síndrome de Waarderburg (SW) y HSCR.

1.2.1 Etiopatología y características clínicas de la enfermedad de HSCR

La enfermedad de Hirschsprung o megacolon agangliónico (OMIM 142623) es una neurocristopatía originada por la incapacidad de las CCN para colonizar el intestino por completo durante el desarrollo del SNE como resultado de fallos en los procesos de migración, proliferación, diferenciación y/o supervivencia de las CCN entre la séptima y duodécima semana de gestación. Se caracteriza por la ausencia de los ganglios nerviosos en los plexos mientérico y submucoso en una porción variable del intestino grueso. En los pacientes HSCR la musculatura del colon pierde su inervación y por lo tanto su motilidad, lo que provoca la acumulación de la materia fecal en la región anterior a la zona afectada provocando el megacolon característico [Okamoto y Ueda, 1967; Amiel y cols., 2008] (Figura 14). Los primeros síntomas de la enfermedad se manifiestan en la dificultad de expulsar el meconio durante las primeras 48 horas de vida, posteriormente aparece distensión abdominal, vómitos y enterocolitis neonatal.

La variable extensión de la zona agangliónica se correlaciona con la severidad de la enfermedad, lo que permite clasificarla en dos formas fenotípicas distintas, HSCR de segmento corto (S-HSCR) y HSCR de segmento largo (L-HSCR). El fenotipo S-HSCR se da en el 80% de los casos, la región agangliónica se extiende hasta el plexo esplénico. El fenotipo L-HSCR se da en el 20% de los casos, donde la aganglionosis se da más allá de dicho plexo. Este último fenotipo incluye a la forma más severa de la enfermedad y menos común (3-8%), caracterizada por la afectación total del colon (TCA) [Chakravarti y Lyonnet, 2001].

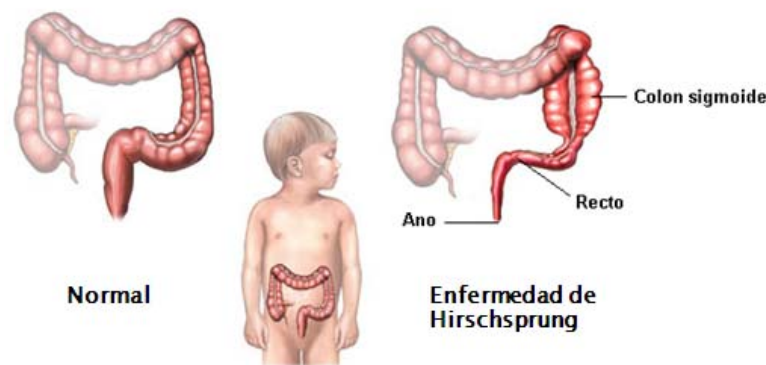


Figura 14. Ilustración del aspecto del intestino grueso de un individuo normal y un paciente HSCR.

Estudios histológicos, inmunohistoquímicos y microscópicos son necesarios para el diagnóstico de los pacientes HSCR, debido a que existen otros trastornos (displasia intestinal neuronal, ganglioneuromatosis intestinal, ganglios inmaduros, hipoganglionosis aislada,

trastornos congénitos de las células musculares lisas y acalasis del esfínter anal interno) que dificultan dicho diagnóstico, realizado normalmente en el periodo neonatal. Para ello, las principales técnicas usadas son radiodiagnóstico mediante enema opaco, manometría ano rectal y biopsia de la pared rectal para análisis anatomopatológico, confirmando el diagnóstico cuando se observa la ausencia de células ganglionares submucosas, lo cual se correlaciona con su ausencia en los ganglios mientéricos [Amiel y Lyonnet, 2001].

El tratamiento existente en la actualidad consiste en la resección de la zona agangliónica y posterior anastomosis de la región sana al ano mediante cirugía, con el objetivo de liberar la contracción tónica del esfínter anal interno provocado por la zona afectada. Esta intervención quirúrgica suele llevarse a cabo en los primeros años de vida del paciente. A pesar de ser el único tratamiento para esta patología, existe un porcentaje significativo de pacientes en los que persisten problemas postoperatorios, como estreñimiento, diarrea o enterocolitis [Prato y cols., 2008; Kapur, 2009; Thapar, 2009].

Factores que van a influir en la recuperación tras la operación son la longitud del segmento agangliónico [Patro y cols., 2008] y la localización de la zona de transición, ya que ésta puede ser hiper/hipogangliónica o parcialmente agangliónica, lo que puede hacer que la función gastrointestinal no se recupere correctamente tras la anastomosis anorectal [Langer, 2004]. Por lo que el análisis histopatológico de las piezas resecionadas es necesario para localizar correctamente dicha zona de transición durante la intervención.

Avances en biología celular y molecular han proporcionado nuevas posibilidades para la terapia en pacientes HSCR. En este sentido, en el tracto gastrointestinal persisten precursores derivados de la cresta neural que han permitido la posibilidad de usarlas como herramienta terapéutica para regenerar los ganglios entéricos en la región patológica de estos pacientes. Tales células incluyen células madre neurales entéricas, neuronas y glía derivadas de la población original de las CCN, que durante la embriogénesis colonizan el intestino para formar el SNE. Estas células precursoras se pueden aislar a partir de tejido intestinal o de biopsias de la mucosa. Su cultivo genera unos agregados celulares llamados neuroesferas o "*neurosphere-like bodies*" (NLBs) [Metzger y cols., 2009a] (Figura 15). Los cultivos de NLBs están formados por CPEs y todos los tipos celulares derivados de éstas, como neuronas, glía y músculo liso, constituyendo la población celular presente en el SNE durante la embriogénesis. Dada la posibilidad de cultivar NLBs tanto de ratón como de humano en el laboratorio, estos cultivos pueden ser una herramienta útil como

modelo celular para la investigación del desarrollo del SNE y de los mecanismos responsables de la aparición de HSCR.

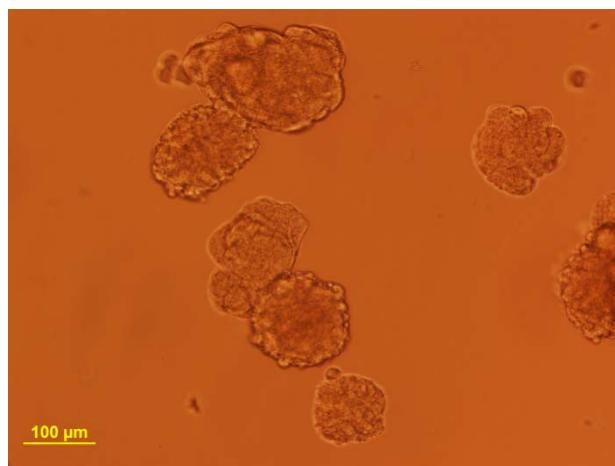


Figura 15. Imagen de un cultivo representativo de NLBs formadas a partir de CPEs procedente de intestino postnatal.

Se ha demostrado la capacidad *in vitro* de las NLBs para colonizar el intestino tras su trasplante [Bondurand y cols., 2003; Almond y cols., 2007; Metzger y cols., 2009a; Metzger y cols., 2009b]. Más recientemente, estudios *in vivo* han confirmado su capacidad de migración, proliferación y diferenciación en glía y los distintos subtipos neuronales [Hotta y cols., 2013; Dettmann y cols., 2014; Hetz y cols., 2014; Nishikawa y cols., 2015; Cooper y cols., 2016], con propiedades neuroquímicas y electrofisiológicas de neuronas entéricas, como entradas sinápticas y proyecciones de neuritas [Hotta y cols., 2013]. También se ha demostrado la habilidad de estas células para formar redes neurales que se integran funcionalmente con la red entérica endógena en el intestino de ratón postnatal, aunque a las pocas semanas las células trasplantadas alcanzan un estado de equilibrio donde dejan de proliferar. Estos avances muestran resultados más limitados en intestinos agangliónicos, con la dificultad adicional de la baja supervivencia de los modelos animales con aganglionosis [Cooper y cols., 2016].

El éxito en un futuro de la terapia celular en HSCR requiere la superación de varios retos, debido a que la deficiencia del SNE en estos pacientes es absoluta y de extensión variable, por tanto es necesario el restablecimiento de todos los subtipos celulares presentes en el intestino maduro, además de la integración celular y la formación de las conexiones y circuitos necesarios para el correcto funcionamiento del intestino. Sin embargo, recientemente se ha propuesto la posibilidad de que no sea necesaria la restauración completa de la región agangliónica, ya que el

transplante de dichas células madres neurales a regiones específicas del intestino patológico (esfínter anal aganglionar) mejoraría la funcionalidad intestinal, y aunque no curaría la enfermedad pero mejoraría los resultados de las cirugías actuales [Burns y Thapar, 2014].

1.2.2 Epidemiología de HSCR

HSCR afecta a 1 de cada 5000 nacidos vivos en la población caucásica [Amiel y cols., 2008], manifestándose preferentemente en hombres con un promedio 4:1, aunque puede variar dependiendo de la longitud del fragmento afectado. Lo más frecuente es que la enfermedad aparezca de manera aislada, sin historia familiar previa, denominándose HSCR esporádico, aunque existen casos familiares con patrones de herencia autosómicos tanto dominantes como recesivos, con penetrancia incompleta y expresión variable [Amiel y Lyonnet, 2001]. Aunque el 70% de los casos HSCR aparecen sin manifestaciones clínicas adicionales, denominándose HSCR aislado, el 30% restante manifiesta junto con la aganglioneosis, otros desórdenes genéticos o malformaciones congénitas, siendo los más frecuentes las que afectan a estructuras derivadas de la cresta neural, llamados HSCR sindrómico (Tabla 1) [Borrego y cols., 2013]. Existe un mayor número de casos de pacientes HSCR familiares (39%) que presentan otras anomalías con respecto a los HSCR esporádicos (21%). Además, en estos casos familiares y sindrómicos, el modelo de herencia que siguen es mendeliana [Amiel y cols., 2008].

Por otra parte, aproximadamente un 12% de los casos HSCR aparecen asociados a alguna anomalía cromosómica, siendo el síndrome de Down (SD, OMIM 190685) la más frecuente, dándose en un 90% de los casos [Chakravarti y Lyonnet, 2001]. La trisomía 21 se observa con una frecuencia de un 40% mayor en pacientes HSCR que en la población normal [Gabriel y cols., 2002]. Por tanto, parece que una copia adicional del cromosoma 21 aumenta la susceptibilidad de padecer HSCR, pero no provoca *per se* la aparición de dicha enfermedad [Arnold y cols., 2009].

Tabla 1. Síndromes asociados a HSCR [Adaptado de Borrego y cols., 2013].

	Síndromes	OMIM	Rasgos característicos
Otras Neurocristopatías	Síndrome de Shah-Waardenburg)	277580	Anomalías en la pigmentación (mechón blanco, iris bicolor, hipopigmentación irregular), y sordera
	Yemenite deaf-blind Hipopigmentación	601706	Pérdida de audición, anomalías oculares (microcórnea, coloboma, nistagmo), anomalías en la pigmentación.
	BADS	227010	Pérdida de audición, hipopigmentación de la piel y retina
	Piebaldismo	172800	Hipopigmentación irregular de la piel
	Haddad o Enfermedad de Ondine	209880	Hipoventilación central congénita
	MEN2	171400	Carcinoma medular de tiroides, feocromocitoma, hiperparatiroidismo
	Riley-Day	223900	Anomalías del sistema nervioso autónomo
HSCR siempre asociado	Goldberg-Shprintzen	235730	Fisura palatina, hipotonía, microcefalia, retraso mental, rasgos faciales dismórficos
	HSCR con anomalías límbicas	235740	Polidactilia, agenesia renal unilateral, hipertelorismo, sordera
		235750	Polidactilia postaxial, defecto en el septo ventricular
		235760	Hipoplasia de las falanges distales y uñas, rasgos dismórficos
		604211	Polidactilia preaxial, defecto cardíaco, anomalías laríngeas
		306980	Braquidactilia tipo D
	BRESHEK	-	Anormalidades cerebrales, retraso, displasia ectodérmica, malformaciones esqueléticas, anomalías de ojo y oído, displasia renal
HSCR Ocasionalmente asociado	Mowat-Wilson	235730	Microcefalia , epilepsia, gestalt facial, hipospadias, anomalías renales ...
	Bardet-Biedl	209900	Retinopatía pigmentaria, obesidad, hipogenitalismo, leve retraso mental, polidactilia postaxial
	Kauffman-McKusick	236700	Hidrometrocolpo, polidactilia postaxial, defecto cardíaco congénito
	Smith-Lemli-Opitz	270400	Retraso en el crecimiento, microcefalia, retraso mental, hipospadia, sindactilia de 2-3 dedos de los pies, rasgos dismórficos
	Hipoplasia de cartilago y cabello	250250	Enanismo, displasia metafisaria, inmunodeficiencia
	HSAS/MASA	307000	Hidrocefalia , estenosis del acueducto , spasticidad aducidas ,retraso mental...
HSCR raramente asociado	Distrofia muscular congénita de Fukuyama	253800	Distrofia muscular, polimicrogiria, hidrocefalia, apoplejía.
	Clayton-Smith	258840	Rasgos dismórficos, dedos y uñas hipoplásicas, ictiosis
	Kaplan	304100	Agénesia del cuerpo calloso, pulgares cortos, ptosis, debilidad muscular
	Okamoto	308840	Hidrocefalia, fisura palatina, agénesia del cuerpo calloso
	Displasia mesomélica de Werner	188770	Hipoplasia de la tibia con polidactilia
	Pitt-Hopkins	610954	Encefalopatía epiléptica , rasgos dismórficos faciales , episodios de hiperventilación , disautonomía
	Jeune	208500	Severamente restringido a caja torácica , extremidades cortas, baja estatura , y polidactilia
Miscelánea	Pierre Robin	261800	Glosoptosis , micrognatia y paladar hendido
	Pallister-Hall (CAVE)	146510	Hamartoma hipotalámico , disfunción pituitaria, polidactilia central y malformaciones viscerales
	Fryns	229850	Hernia diafragmática , cara anormal, y anomalías de las extremidades distales
	Aarskog	100050	Baja estatura , hipertelorismo , y el escroto chal
	Displasia Fronto-nasal	136760	Hipertelorismo ocular , ampliación de la raíz nasal , paladar hendido y otros rasgos.
	Osteopetrosis	Various	Macrocefalia , sordera y ceguera progresiva , hepatoesplenomegalia y anemia severa
	Goldenhar	164210	Anomalías craneofaciales , cardíacas, vertebrales, y defectos del sistema nervioso central
	Lesch-Nyhan	300322	Retraso mental , parálisis cerebral espástica , coreoatetosis , cálculos urinarios de ácido úrico
	Rubinstein-Taybi	180849	Pulgares anchos y pies grandes, facies característica , y retraso mental
	Toriello-Carey	217980	Agenesia del cuerpo calloso , con anomalías faciales y secuencia robin
	SEMDJL	271640	Anomalías vertebrales y laxitud ligamentosa con resultado de muerte temprana
	OSCS	300373	Striata osteopathia con esclerosis craneal

1.2.3 Genética molecular de HSCR

HSCR presenta una etiología genética compleja considerándose como enfermedad multigénica, de modo que normalmente muestra un patrón de herencia multifactorial y no mendeliano. Por tanto, la aparición de la enfermedad viene dada por la presencia conjunta de alteraciones en más de un gen actuando de manera aditiva con baja penetrancia, expresión variable y dependiente de sexo [Borrego y cols., 2013].

Como hemos visto, el desarrollo del SNE es un proceso complejo que requiere un exhaustivo control donde intervienen numerosos participantes. Alteraciones en algunos de los genes codificantes de proteínas implicadas en este proceso podrían contribuir a la aparición de la enfermedad. De este modo, la enfermedad puede darse por la presencia de una mutación patogénica severa en uno de los genes cruciales para la formación del SNE, por la suma de mutaciones menos severas en varios genes o por la combinación de ambos casos. Actualmente se han asociado al menos 40 genes con la aparición de la enfermedad. Todos los genes asociados con la enfermedad codifican elementos que de alguna manera están involucrados en el desarrollo de la cresta neural y del SNE, siendo el protooncogén RET el principal gen de susceptibilidad para la enfermedad. Mutaciones en RET explican aproximadamente el 50% de los casos HSCR familiares y el 10-20% de los casos esporádicos. Aproximadamente el 5% del resto de los casos HSCR, se deben a mutaciones en otros genes asociados hasta el momento con la enfermedad, como *GDNF*, *NRTN*, *PSPN*, *EDNRB*, *EDN3*, *ECE1*, *NTF3*, *NTRK3*, *SOX10*, *PHOX2B*, *L1CAM*, *ZFHX1B*, *KIAA1279*, *TCF4*, *PROK1*, *PROKR1*, *PROKR2*, *GFRA1*, *NRG1*, *NRG3*, *SHH*, *SEMAFORINA3* (3A, 3C y 3D) y *DNMT3b* entre otros (Tabla 2) [Borrego y cols., 2013; Heuckeroth y Schäfer, 2016]. Principalmente los casos esporádicos de la enfermedad siguen un modelo aditivo, en el que la aparición de HSCR se da por la presencia de alteraciones en distintos genes que actúan de forma multiplicativa modulando la expresión de la enfermedad o la penetrancia de las mutaciones. Por tanto, todo esto hace necesaria la búsqueda de nuevos genes que participen en la aparición de HSCR para esclarecer la etiología de la enfermedad.

Tabla 2. Principales genes asociados a HSCR [adaptada de Butler y cols., 2013].

Gen	Migración	Proliferación	Diferenciación	Supervivencia/Muerte Celular
<i>RET</i>	Atraído por GDNF	Promueve la proliferación	Promueve la diferenciación neuronal	Promueve la supervivencia de las CCN y neuronas entéricas, inhibe la muerte celular no apoptótica
<i>GDNF</i>	Gradiente para atraer a CCN RET+ y GFR α -1+	Promueve la proliferación	Promueve la diferenciación neuronal	Promueve la supervivencia
<i>GFRα-1</i>	Atraído por GDNF, necesario para cruzar el mesenterio			Promueve la supervivencia de neuronas entéricas
<i>EDNRB</i>	Necesario para una correcta migración	Mantiene el estado proliferativo		
<i>EDN3</i>	Necesario para una correcta migración, mantiene un ambiente permisivo		Inhibe la diferenciación neuronal	
<i>ZFHX1B</i>	Especificación neural, transición epitelio-mesenquimal			
<i>PHOX2B</i>	Expresado en CCN migratorias			
<i>SHH</i>	Opuesto a GDNF, reduce la migración	Promueve la proliferación	Inhibe la diferenciación neuronal al afectar la capacidad de respuesta a GDNF	
<i>SOX10</i>		Mantiene el estado progenitor		
<i>NRTN</i>		Promueve la proliferación	Promueve la diferenciación neuronal	Promueve la supervivencia

1.2.3.1 RET, GDNF y GFR α -1 en HSCR

Como ya se ha comentado, muchos genes contribuyen en la formación del SNE, y mutaciones en algunos de estos genes podrían causar HSCR, siendo los dos principales genes responsables de ello *RET* y *GDNF*. En pacientes HSCR se han identificado numerosas mutaciones en el gen *RET* tanto en regiones codificantes como no codificantes, lo que podría resultar en una reducción de dicho receptor en la superficie celular. Estudios bioquímicos han demostrado que las mutaciones en las regiones codificantes de *RET* pueden tener consecuencias variables: si afectan al dominio extracelular dan lugar a alteraciones del transporte de RET a la membrana plasmática; si afectan al dominio rico en cisteína dan lugar a la dimerización covalente de la proteína y por tanto se reduce su localización en la membrana plasmática; si afectan al dominio quinasa causan la alteración o interrupción de su actividad catalítica; finalmente, si dichas mutaciones se localizan en el extremo carboxi-terminal van a afectar a la unión de las proteínas y por tanto, van a alterar su señalización. Sin embargo, aunque los efectos de estas mutaciones sean distintos, el resultado es el mismo, una insuficiencia en la actividad de RET [Kashuk y cols., 2005].

Por otro lado, algunas de las mutaciones en *RET* encontradas en los pacientes HSCR se localizan en las regiones no codificantes. Dichas mutaciones aumentan la susceptibilidad de la aparición de la enfermedad si se dan junto con otras mutaciones, atendiendo al modelo aditivo de la enfermedad. Además, dichas mutaciones están involucradas en la regulación de importantes mecanismos celulares, como la transcripción. Una de ellas, c.73+9277C>T, localizada en el intrón 1 de *RET* en un dominio conservado con función reguladora de la transcripción (*enhancer-like*), es un factor de susceptibilidad genético para la aparición de la enfermedad [Emison y cols., 2005]. Concretamente, esta mutación afecta al sitio de unión del factor de transcripción SOX10, lo que disminuye la transcripción de *RET* [Emison y cols., 2010]. Otra variante localizada próxima a la anterior, c.73+9494A>C, ha sido identificada como un sitio de unión para los factores de transcripción heterodímeros NXF/ARNT2 y SIM2/ARNT2, moduladores de la expresión de *RET*. Por tanto, la existencia de variaciones en regiones no codificantes pueden influir en la expresión de genes importantes para el desarrollo, ayudando en última instancia a la aparición de HSCR [Sribudiani y cols., 2011]. Por otra parte, la delección de *Ret* en ratón produce una completa aganglionosis del intestino [Schuchardt y cols., 1994], y del mismo modo, la bajada de expresión de *Ret* en pez cebra provoca la ausencia de neuronas entéricas en el intestino [Shepherd y cols., 2004].

La importancia que tiene RET en HSCR convierte a los genes que codifican su complejo de activación en posibles genes candidatos implicados en la aparición de la enfermedad. En este

sentido, su ligando GDNF y su coreceptor GFR α -1 también se han asociado a la enfermedad. El complejo formado por RET, GDNF y GFR α -1 es esencial tanto para la activación de RET como para la correcta formación del SNE, ya que similares fenotipos con aganglionosis se observan en ratón y en pez cebra en ausencia de alguna de estas proteínas [Schuchardt y cols., 1994; Sanchez y cols., 1996; Cacalano y cols., 1998; Shepherd y cols., 2001; Shepherd y cols., 2004]. Mutaciones en *GDNF* se han identificado en pacientes HSCR, aunque a menudo en combinación con mutaciones en *RET* o con otras alteraciones genéticas como la trisomía 21 [Angrist y cols., 1996; Hofstra y cols., 2000; Eketjäll e Ibáñez, 2002; Ruiz-Ferrer y cols., 2011]. En cuanto a *GFR α -1*, una delección en este gen fue identificada en dos familias HSCR no relacionadas [Borrego y cols., 2003]. Estas mutaciones son consideradas como cambios genéticos con un efecto modulador que contribuyen a la enfermedad junto con otros loci de susceptibilidad.

1.2.3.2 SOX10 en HSCR

La importancia de SOX10 en HSCR se evidenció a través del estudio del ratón Dom (*Dominant megacolon*), modelo para el síndrome de Waardenburg 4 (SW4) [Lane y Liu, 1984]. El síndrome de Waardenburg (SW) es una enfermedad rara caracterizada por la presencia de anomalías pigmentarias y sordera debido a fallos en la proliferación, supervivencia, migración y/o diferenciación de los melanocitos derivados de la cresta neural. Aunque existen varios tipos de SW, se denomina SW4 cuando aparece en combinación con HSCR, siendo una mutación en el gen *Sox10* lo que provoca el fenotipo de los ratones Dom [Southard-Smith y cols., 1998; Southard-Smith y cols., 1999]. Los ratones heterocigotos para dicha mutación presentan aganglionosis colónica distal e hipomelanosis en la piel y el pelo, lo cual indica que los melanocitos derivados de la cresta neural y las CPEs están afectados en dichos mutantes. En cambio, la presencia de esta mutación en homocigotos en ratones Dom, es letal para el embrión. Además, la localización de mutaciones en *SOX10* correlacionan con la longitud del segmento agangliónico. Así, mutaciones en el dominio de unión al ADN conducen a una hipoganglionosis o S-HSCR, mientras que mutaciones en el dominio de transactivación producen L-HSCR o TCA [Sham y cols., 2001]. Aunque mutaciones en *SOX10* se han asociado a formas sindrómicas de HSCR [Bondurand y cols., 2007], una mutación patogénica en *SOX10* ha sido encontrada en un paciente HSCR aislado [Sánchez-Mejías y cols., 2010], además de una expresión anormal en intestinos agangliónicos de pacientes HSCR aislado [Pingault y cols., 1998; Chan y cols., 2003]. Estos estudios evidencian la asociación de *SOX10* con la patogénesis de HSCR *per se*.

1.2.4 Epigenética en HSCR

Varios mecanismos epigenéticos han sido descritos para el desarrollo de las CCN. Alteraciones en ellos provocan una serie de patologías humanas, siendo una de ellas HSCR [Torroglosa y cols., 2016]. Debido a que la epigenética en HSCR es un tema relativamente reciente, los mecanismos epigenéticos que regulan la expresión de genes implicados en la enfermedad aún no son del todo conocidos, siendo un campo en auge actualmente, por lo que el papel de los cambios epigenéticos en la patogenésis de HSCR aún no se entiende completamente.

1.2.4.1 Metilación de ADN en HSCR

Varios genes asociados a HSCR están regulados por la metilación del ADN, existiendo diferencias de metilación entre individuos enfermos y sanos. Hasta el momento se conocen varios genes asociados a HSCR (*RET*, *EDNRB*, *PHOX2B* y *PAX6*) cuya regulación es a través de la metilación.

El promotor de *RET* tiene una región rica en 5'-CG-3' susceptible de ser metilada, ya que se ha evidenciado que en algunos tejidos humanos adultos, incluyendo a los glóbulos blancos de pacientes HSCR, la expresión de *RET* está regulada por la metilación en esta región [Munnes y cols., 1998]. En este sentido, posteriormente se demostró que la activación de la expresión de *RET* inducida por el ácido retinoico es a través de la metilación de su región rica en CG [Angrisano y cols., 2011]. Por otro lado, recientemente se ha visto que un posible marcador de pronóstico en pacientes de cáncer colorrectal en estadio II es la metilación de islas CpG del promotor de *RET* [Draht y cols., 2016]. Por tanto, parece que la expresión de *RET* está regulada por la metilación del ADN, indicando que este mecanismo epigenético podría estar implicado en la aparición de HSCR.

La interacción del receptor *EDNRB* con su ligando *EDN3* es esencial para el desarrollo de los ganglios entéricos y las células pigmentarias derivadas de la cresta neural [McCallion y Chakravarti, 2001]. Además, *EDNRB* está asociado a HSCR, ya que mutaciones en este gen se han encontrado en pacientes HSCR [Puffenberger y cols., 1994]. Recientemente se ha visto que la expresión de este gen está aumentada en tejidos HSCR con respecto a tejidos control, lo que correlaciona con el descenso de metilación encontrado en *EDNRB* [Tang y cols., 2013a]. De modo que de nuevo parece que la inactivación epigenética por metilación de genes implicados en HSCR es importante para el desarrollo de la enfermedad.

PHOX2B es un factor de transcripción que junto a SOX10, es responsable de la diferenciación de las CCN en neuronas y glía [Pattyn y cols., 1999]. Este gen es causante de varias enfermedades, entre ellas HSCR. En este caso no se ha encontrado aún una relación entre la regulación epigenética de este gen y HSCR, aunque en neuroblastoma, enfermedad en la que también está implicado *PHOX2B*, se encontró en algunos casos una metilación aberrante en la región promotora del gen. Este tipo de cáncer es originario de las CCN, por lo que estos resultados sugieren que el estado de metilación de este gen podría tener un papel importante en la regulación de los procesos de las CCN [de Pontual y cols., 2007], y por tanto podría también tenerlo en HSCR.

Por último, PAX6 es un factor de transcripción involucrado en el desarrollo embrionario y ha sido asociado a HSCR recientemente y cuya expresión también parece estar regulada a través de la metilación del ADN [Enguix-Riego y cols., 2016].

1.2.4.1.1 Metilación *de novo* en HSCR- DNMT3b

Se ha descrito que la *de novo* metiltransferasa *DNMT3b* está implicada tanto en el desarrollo del SNE, como en la aparición de HSCR. Las CPEs aisladas de pacientes presentan un descenso de la expresión de *DNMT3b* con respecto a controles, lo que correlaciona además con la bajada de los niveles de metilación global del ADN en estos pacientes. Además, tres mutaciones patogénicas en dicho gen se han encontrado en pacientes HSCR. La mutación p.Gly25Arg, fue encontrada en dos pacientes HSCR no relacionados entre si y ambos con fenotipo L-HSCR, teniendo además uno de ellos una segunda mutación en este gen, p.Gly198Trp. Ambos pacientes presentaban mutaciones en otros genes ya asociados con la enfermedad. La tercera mutación, p.Arg190Cys fue también encontrada en un paciente con fenotipo L-HSCR. Es posible que mutaciones en *DNMT3b* actúen como modificadores del fenotipo al presentarse junto con mutaciones en otros genes relacionados con HSCR, contribuyendo a la aparición de un fenotipo más severo en estos pacientes. Esto está en concordancia con el modelo multigénico y complejo propuesto para HSCR, donde un mayor número de mutaciones en genes clave para el desarrollo y efectos más dañinos de las mutaciones darán lugar a porciones de aganglionosis de mayor longitud. Es interesante destacar que las tres mutaciones encontradas, se encuentran en una región de la proteína que interacciona con *DNMT1* y *DNMT3a* para realizar el establecimiento del patrón de metilación *de novo* que ocurre durante el desarrollo embrionario, por lo que estas mutaciones podrían impedir el establecimiento de unos patrones de metilación correctos y por tanto también una regulación de la expresión génica apropiada para un correcto desarrollo embrionario. Estos resultados indican que *DNMT3b* estaría

regulando el desarrollo del SNE al establecer los patrones de metilación del ADN en CPEs, y por tanto, un patrón de metilación aberrante podría tener como consecuencia fallos en el desarrollo, dando lugar a HSCR [Torroglosa y cols., 2014].

1.2.4.2 Otros mecanismos epigenéticos implicados en HSCR

1.2.4.2.1 PRC2

La proteína de unión al ADN, AEBP2, tiene como diana muchos de los genes implicados en la enfermedad de HSCR, como son *Ret*, *Gdnf*, *Ednrb*, *Edn3*, *Sox10* y *Phox2b*. Ratones mutantes heterocigotos para *Aebp2* muestran síntomas similares a pacientes con SW4, como megacolon, causado por la ausencia de ganglios derivados de la cresta neural en el intestino, hipopigmentación y defectos de audición. Además, estos mutantes han mostrado la función de *Aebp2* en tejidos derivados de la cresta neural. Mutaciones en homocigosis son letales en la etapa embrionaria, mientras que mutaciones en heterocigosis provocan modificaciones en los niveles de expresión de genes clave para el desarrollo de la cresta neural, siendo la más destacada una bajada de expresión de *Sox10*, lo que se observa frecuentemente en pacientes SW4. Esto sugiere que AEBP2 y por tanto PRC2, participa en el desarrollo de las CCN a través de la regulación epigenética de sus genes diana, como *SOX10*, y por tanto contribuyendo a la aparición de HSCR y SW4 [Kim y cols., 2011].

1.2.4.2.2 ARN no codificantes

Los transcritos no codificantes (ncARN) pueden tener un papel estructural como el ARN ribosómico, o un papel regulador de la expresión génica como los microARN (miARN) y *long non coding* ARN (lncARN). Los miARN tienen una longitud de 19-24 pb y su función es inhibir la expresión de genes por complementariedad de secuencia con las regiones 3'UTR de los ARN mensajeros de sus dianas. Esta inhibición la realiza principalmente por dos procesos: degradación de ARNm y represión traduccional [Gu y Kay, 2010]. Los lncARN son transcritos de más de 200 pb y están involucrados en procesos como la remodelación de cromatina y regulación transcripcional o post-transcripcional, sirviendo además como precursores para la producción de pequeños ARNs [Kaikkonen y cols., 2011]. En el contexto de HSCR, se han encontrado varios miARN y lncARN diferencialmente expresados en pacientes HSCR, donde además existe una desregulación de la expresión de sus genes diana provocando efectos a nivel proliferativos y migratorios (Tabla 3). Es interesante destacar el MiR-141 que en pacientes HSCR se ha encontrado la hipermetilación en las islas CpG de su región promotora, lo que confirma que los niveles de expresión de este miARN

están regulados por el estado de metilación de su promotor [Tang y cols., 2013b].

Tabla 3. Cambios en ncARN y genes asociados en HSCR.

	ncARN	Expresión en HSCR	Cambio en gen/proteína	Efecto	Referencia
MiARN	MiR-195	↑	DIEXF↓	↓ proliferación y migración	Lei y cols., 2014
	MiR-206	↓	SDPR↑	↓ proliferación y migración	Sharan y cols., 2015
	MiR-192/215	↓	NID1↑	↓ proliferación y migración	Zhu y cols., 2015
	MiR-141	↓	CD47/CUL3↑	↓ proliferación y migración	Tang y cols., 2013b
	MiR-200a/141	↓	PTEN↑	↓ proliferación y migración	Li y cols., 2014
	MiR-218-1	↑	SLIT2 ↑ RET/PLAG1↓	↓ proliferación y migración	Tang y cols., 2015
LncARN	HOTTIP	↓	HOXA13↓	↓ proliferación y migración	Xie y cols., 2015
	HA117	↑	DPF3↓		Liu y cols., 2014
	HA117	↑	FOXA1/DUSP6↓		Luo y cols., 2015
	LOC101926975	↓	FGF1↓	↓ proliferación	Shen y cols., 2016

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis de trabajo

Teniendo presente la complejidad del desarrollo del SNE, lo que conlleva a que la etiología de HSCR no se conozca completamente, nuestra principal meta en este trabajo es contribuir al esclarecimiento de ambos procesos. En este sentido, nuestro estudio se centra en un ámbito epigenético donde *DNMT3b* es nuestro protagonista debido a la bajada de expresión y a la menor metilación global del ADN detectada en pacientes HSCR. Por tanto, hipotetizamos que DNMT3b tiene un papel fundamental durante la formación del SNE regulando los procesos celulares requeridos para ello, mediante la regulación de un patrón de expresión génica específico, y que fallos en el mismo contribuiría o desencadenaría la aparición de dicha enfermedad.

2.2 Objetivos

Por todo ello se establecieron los siguientes objetivos:

- 1) Evaluación de la bajada de expresión de la *de novo* metiltransferasa *DNMT3b* sobre la proliferación, supervivencia y diferenciación de CPEs de ratón.
- 2) Esclarecer las vías de señalización y mecanismos implicados en el posible papel de *DNMT3b* sobre los procesos celulares de los precursores entéricos y por tanto en el desarrollo del SNE y aparición de HSCR.
- 3) Esclarecer el patrón de expresión génica regulado por DNMT3b mediante la técnica ChIP-Seq para identificar los genes diana de DNMT3b en CPEs de ratón.
- 4) Evaluación de la posible implicación de los genes dianas de DNMT3b identificados en las CPEs de ratón en la enfermedad de HSCR. Todo ello mediante un estudio de expresión diferencial entre precursores entéricos procedentes de pacientes HSCR e individuos sanos, así como mediante la búsqueda de variantes raras asociadas a HSCR en dichos genes.

3. METODOLOGÍA

3.1 Pacientes y Controles

Todos los individuos incluidos en el estudio firmaron un consentimiento informado para cirugía, y estudios de genética clínica y molecular siguiendo las normas de protección de los sujetos humanos contenidas en la declaración de Helsinki, así como lo estipulado en la Ley de Investigación Biomédica (Ley 14/2007, del 3 de Julio de 2007). Así mismo, también han sido aprobados por el Comité de Ética e Investigación Clínica del Hospital Universitario Virgen del Rocío (Sevilla, España).

3.1.1 Pacientes HSCR

Los pacientes HSCR incluidos en el estudio fueron remitidos a la Unidad de Gestión Clínica (UGC) de Genética, Reproducción y Medicina Fetal procedentes de la UGC de Cirugía Infantil del Hospital Universitario Virgen del Rocío, centro de referencia autonómica para esta patología, y de Servicios de Genética de otros hospitales españoles. El protocolo de estudio clínico de los pacientes HSCR incluye:

- Historia clínica.
- Estudio radiológico mediante enema opaco.
- Manometría ano-rectal.
- Estudio anatomopatológico.
- Estudios de genética clínica mediante la realización del árbol genealógico, valoración de la transmisión familiar, clasificación de los sujetos en riesgo, análisis de la heterogeneidad clínica intra y extrafamiliar y extracción protocolizada de muestras de sangre del paciente índice y de sus familiares para el estudio molecular.

El presente trabajo contó con muestras de ADN genómico de un total de 39 pacientes HSCR esporádicos (29 S-HSCR y 10 L-HSCR) y 17 casos familiares (9 S-HSCR, 3 L-HSCR y 6 con fenotipo no disponible).

Las muestras de intestino de pacientes HSCR, fueron recogidas en quirófano tras la intervención quirúrgica en la UGC de Cirugía Infantil del Hospital Universitario Virgen del Rocío. Los pacientes intervenidos tienen una edad comprendida entre 3 meses y 5 años. Para el estudio se obtuvieron precursores neurales a partir de tejido intestinal de 14 pacientes.

3.1.2 Individuos control

Un grupo control constituido por 267 individuos no relacionados entre sí y sin ningún antecedente personal o familiar relacionado con HSCR fue utilizado para la evaluación de las variaciones identificadas en pacientes, ya que es necesario comparar la frecuencia de dichas variantes con un grupo control.

Las muestras de intestino utilizadas como controles se obtuvieron de individuos en edades comprendidas entre 3 meses y 3 años sometidos a cirugía intestinal sin sospecha de HSCR, la cuales son recogidas del mismo modo que las muestras de pacientes, en la Unidad de Cirugía Infantil del Hospital Virgen del Rocío. Para el estudio se obtuvieron precursores neurales extraídos a partir de tejido intestinal de 5 controles.

3.2 Animales de experimentación – Ratones

Para el estudio se utilizaron ratones silvestres de la estirpe CD1. Fueron mantenidos y utilizados según la normativa del animalario del Instituto de Biomedicina de Sevilla, de acuerdo con las normativas españolas (BOE 67/8509-12) y de la Unión Europea (86/609/EU).

3.3 Técnicas generales utilizadas para estudios moleculares de ADN genómico

3.3.1 Extracción de ADN a partir de sangre periférica

La extracción de ADN genómico se realizó de forma automática con el equipo *MagNA Pure LC 1.0* (Roche Diagnostics) a partir de sangre periférica de los pacientes y sus familiares, así como de los controles. La extracción se llevó a cabo mediante la tecnología de partículas magnéticas, usando los componentes de *MagNA Pure LC ADN Isolation Kit- Large Volume* (Roche Diagnostics, Alemania). El protocolo utilizado fue el *V3_8_ADN LV Blood 1000*, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Finalmente a partir de 1 ml de sangre periférica, obtuvimos 200ul de ADN a una concentración aproximada de 100 ng/μl.

3.3.2 Espectrofotometría de ADN

Para conocer la pureza y concentración del ADN obtenido se utilizó el sistema de espectrofotometría *NanoDrop 8000* (Thermo Scientific, USA). Este sistema permite medir la

absorbancia a varias longitudes de onda, por tanto para estimar la pureza de la solución de ADN se utiliza el cociente 260nm/280nm, ya que a 260nm se miden los ácidos nucleicos y a 280 nm las proteínas. De esta forma, el cociente entre ambas medidas da una estimación de la pureza de la muestra, debiendo estar este valor entre 1,6 y 2.

3.3.3 Amplificación de ADN genómico mediante PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite la amplificación de manera exponencial de un fragmento concreto de ADN mediante la selección por su secuencia específica. Se desarrolla principalmente en tres pasos:

- *Desnaturalización*: Separación de la doble cadena de ADN. Cada una de estas cadenas actúa como molde para fabricar la hebra complementaria. Esta fase se realiza a 94°C.
- *Hibridación*: Los cebadores se unen a las cadenas simples en la región que se quiere amplificar por complementariedad. La temperatura en esta fase es variable, ya que depende de la secuencia de los cebadores diseñados, principalmente de su contenido en bases Guanina-Citosina.
- *Extensión*: La enzima ADN polimerasa incorpora los desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) y extendiendo la hebra que se está sintetizando. Esta fase se realiza a 72°C.

Los reactivos utilizados y las cantidades utilizadas para un volumen final de 25 µl (Tabla 4), así como las condiciones de amplificación (Tabla 5) se detallan a continuación:

Tabla 4. Reactivos utilizados en la PCR estándar.

Reactivos	Cantidad
ADN genómico	1µl (10ng)
Tampón de MyTaq 5x (Bioline)	5µl (1X)
Solución de cada primer (10µM)	1µl (0,2µM)
MyTaq ADN polimerasa (Bioline)	0,5µl
H2O csp	16,5µL
Volumen total	25µl

Tabla 5. Condiciones generales de amplificación. * Th: Temperatura de hibridación.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	1'	25
Desnaturalización	95	15''	
Hibridación	Th *	15''	
Extensión	72	10''	
Conservación del Producto	4	∞	

Los cebadores utilizados para el rastreo mutacional de los genes se diseñaron con el programa Primer3. Las secuencias de cada cebador y las temperaturas usadas para la hibridación de cada pareja de cebadores se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Secuencias de los cebadores utilizados para el rastreo mutacional.

Gen	Secuencia Forward (5'-3')	Secuencia Reverse (5'-3')	Tamaño (pb)	Th (°C)
<i>Sulf1</i>	TGCAAGACTCACAGCAACAA	AGTCGCTGTCTCTGCATGG	311	61
<i>Cdk5rap2-1</i>	GGGATGATTGTCATGTGCAG	TCCGTGCAGTTGTTTCAGTTC	445	61
<i>Cdk5rap2-2</i>	TTGAGCAGGAAAAGCATGTG	CAGGGGTCAGGATCAAAGAG	222	61
<i>Cdk5rap2-3</i>	GCAGTAATTTAGCAAAGTCAAACACA	AAAAATCAACCCATGCCAAA	302	61
<i>Cdk5rap2-4</i>	TCTCCCACTTCCTTCCCTTT	CTAGCTGGGCCTCACAAGAC	228	61
<i>Bbx-1</i>	CTGGCTTTGTTTTGGTGGT	GGAGTTTCAGGACTGGTTGC	324	61
<i>Bbx-2</i>	TGCTCTTCTAAAGGGATTGAGG	TCCATTCCAGTATTCCTGAGC	280	61
<i>Rab10</i>	CTGAGCTCGTCGACTTAGGG	CTCACTACGGCCAACCTCCTC	385	61
<i>Ppp2r2b-1</i>	CTGGTTCCTTCCTTGACTCG	TACGGAGCTGACTCCCATT	334	61
<i>Ppp2r2b-2</i>	CAGCTTCCTAGCCAGTCCAA	TATCACCATGCATTGCCTTC	367	61
<i>Ppp2r2b-3</i>	GAGTCCAACATTCCCAGCTC	CCTCATTTTATCGCAGCAGA	201	61

3.3.4 Electroforesis en gel

Tras la PCR se realizó una electroforesis para comprobar la amplificación y el tamaño de los fragmentos. La electroforesis se llevó a cabo en geles de agarosa al 2% p/v, teñidos con bromuro de etidio (10 mg/ml) y visualizados bajo luz ultravioleta con el sistema *ChemiDoc™ XRS+ Imaging System* (Biorad, USA). Para la comprobación del tamaño correcto de los fragmentos se utilizó el marcador de peso molecular V de Roche Diagnostics (Alemania).

3.3.5 Secuenciación automática de los productos de PCR

La secuenciación permite determinar la secuencia nucleotídica exacta de los fragmentos amplificados previamente mediante PCR. Tras la PCR, la secuenciación se desarrolla principalmente en cuatro fases:

- *Purificación de los productos de PCR*: Mediante *ExoSAP-IT* (USB Corporation, USA) se

procede a la purificación enzimática de cebadores y dNTPs no consumidos en la reacción. *ExoSAP-IT* contiene dos enzimas hidrolíticas: la Exonucleasa I, que degrada los cebadores y otros ADNs de cadena simple no específicos, y una fosfatasa alcalina que hidroliza los residuos de dNTPs. Para la purificación del producto de PCR se añadió *ExoSAP-IT* directamente, tras lo cual se realizaron dos incubaciones: Purificación enzimática a 37°C durante 15 minutos e inactivación enzimática a 80°C durante 15 minutos.

- *Reacción de secuenciación*: Una vez obtenido el producto purificado, se realizó la reacción de secuenciación basada en el método de Sanger [Sanger y cols., 1977] utilizando el kit comercial *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, USA) según las condiciones de reacción y programa de amplificación que se detallan en las Tablas 7 y 8. La reacción se basa en el uso de dideoxinucleótidos (ddNTPs), los cuales están marcados con fluorocromos para la detección e identificación del último nucleótido de cada fragmento durante la secuenciación.

Tabla 7. Reactivos de la reacción de secuenciación.

Reactivos	Cantidad
Producto de la PCR purificado	2µl
Tampón de Secuenciación 5x (Applied Biosystems)	2,5µl
Solución de primer (10 µM)	0,5µl
<i>BigDye® Terminator</i> (Applied Biosystems)	0,5µl
H ₂ O csp	10µl

Tabla 8. Condiciones de la secuenciación por el método Sanger.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	96	3'	35
Desnaturalización	96	10''	
Hibridación	50	5''	
Extensión	60	4''	
Conservación del Producto	4	∞	

- *Purificación de la reacción de secuenciación*: El producto obtenido tras la reacción de secuenciación fue purificado mediante el empleo de placas *Performa® DTR V3 96-Well Short Plate* (EdgeBio, USA), que contienen una matriz de filtración en gel hidratado que asegura la eliminación de aquellos reactivos residuales de bajo peso molecular que quedan tras la

reacción de secuenciación.

- *Secuenciación Sanger*: El producto purificado fue secuenciado por el método Sanger en el secuenciador *ABI Prism® 3730* de 48 capilares (Applied Biosystems, USA). Las condiciones de inyección de voltaje fueron 1,5 KV durante 15 segundos, aunque se pueden modificar los parámetros en función del producto a secuenciar. La electroforesis se realiza dentro de cada uno de los capilares rellenos del polímero *POP-7™ Performance Optimized Polymer* (Applied Biosystems, USA) a 9KV durante 94 minutos (el tiempo de la carrera puede variar en función del tamaño de los productos). El tampón de electroforesis utilizado fue 10X Buffer con EDTA (Applied Biosystems, USA).

3.4 Extracción de precursores neurales crecidos como NLBs a partir del SNE humano y de ratón

Las muestras de intestino procedentes de pacientes HSCR e individuos sometidos a cirugía intestinal sin sospecha de HSCR, se recogieron de quirófano en un tubo estéril envuelto en una gasa humedecida con suero salino, siendo procesadas en un plazo de tiempo no superior a 30 minutos. El protocolo de aislamiento de precursores del SNE a partir de tejido intestinal fue el siguiente:

- *Aislamiento músculo liso*: El manejo del tejido se realizó con ayuda de un bisturí estéril en PBS 1X (*phosphate-buffered saline*, Gibco, Life Technologies, USA) hasta aislar aproximadamente 1cm² de la capa de músculo liso que recubre el intestino.
- *Fragmentación de tejido*: Una vez aislado se realizaron cortes con el objetivo de fragmentar la muestra en pequeños fragmentos de unos 100µm para su posterior centrifugación a 1000 rpm durante 5 minutos.
- *Disgregación del tejido*: El tejido fragmentado se incubó en una solución enzimática de Tripsina 0,26 mg/mL, Hialuronidasa 0,28mg/mL, Dispasa 5mg/mL, Elastasa 3,3 u/mL y Colagenasa 0,6 mg/mL en PBS durante 30 minutos a 37°C en agitación.
- *Bloqueo*: Se añadió medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Gibco, Life Technologies, USA) al 10% de FBS (*Fetal Bovine Serum*, Gibco, Life Technologies, USA) con

el objetivo de detener la reacción enzimática y posteriormente se centrifugó de nuevo.

- *Cultivo celular*: La suspensión celular obtenida se cultivó en frascos *Ultra-Low attachment* (Corning® *Ultra-Low attachment cell culture flasks*, Sigma Aldrich, Alemania), en medio DMEM con penicilina 100U/mL, estreptomicina 100g/mL, 2mM, L-glutamina (Gibco, Life Technologies, USA), 0.05mM de 2-mercaptoetanol, 1% (v/v) de N1 (Sigma Aldrich, Alemania), 10% (v/v) de suero humano y suplementado con 20ng/mL de bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*), 20ng/mL de EGF (*Epidermal Growth Factor*) y 10ng/mL de GDNF (*Glial cell-derived neurotrophic factor*) (Peprtech, Reino Unido).
- *Producción de neuroesferas*: Aproximadamente a las 72 horas ya se pudieron apreciar cuerpos esféricos flotantes denominados Neuroesferas o por su nombre en inglés “*Neurospheres like bodies*” (NLBs).

Para la obtención de CPEs a partir de ratones CD1 se utilizó el tejido muscular obtenido a partir de intestinos de al menos dos ratones postnatales de siete días. El procedimiento fue el mismo que en el caso del aislamiento de precursores humanos, aunque en este caso los factores de crecimiento fueron específicos de ratón.

Las NLBs obtenidas están formadas casi en su totalidad CPEs (P75+). En estos cultivos de NLBs, hay varios tipos celulares dentro de estas células precursoras que constituyen el SNE, como son células neuronales (TUJ1+), astrocitos (GFAP+) y músculo liso (SMA+) (Figura 16).

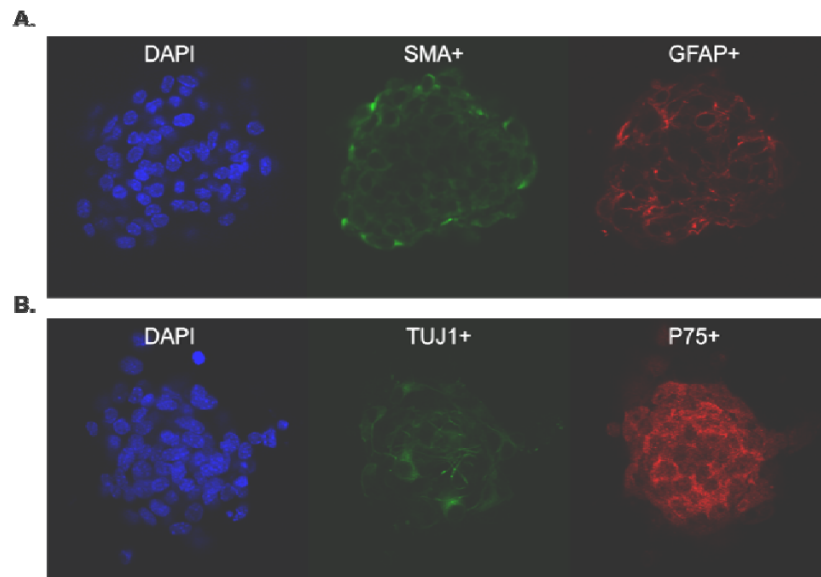


Figura 16. Imágenes de microscopía confocal de dos NLBs. 16A. Células de músculo liso (SMA+) y astrocitos (GFAP+) en la NLB generada. **16B.** Células neuronales (TUJ1+) y CPEs (P75+) en las NLB generada. Cabe destacar que prácticamente la totalidad de las células que componen la NLB son positivas para el marcador de precursor entérico P75, lo que indica que aunque las células que constituyen las NLBs estén comprometidas con el fenotipo neuronal, glial o muscular, todas ellas son CPEs.

3.4.1 Extracción de ARN mensajero (ARNm) y síntesis de ADN complementario (ADNc) a partir de cultivos de precursores de SNE

La extracción de ARNm de los precursores del SNE y su posterior síntesis de ADNc se llevó a cabo en la plataforma *ThermoMACS™ Separator System* (Miltenyi Biotec, Alemania) utilizando el *μMACS™ Onestep cDNA Kit* (Miltenyi Biotec, Alemania) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Este sistema se basa en la adición al lisado celular de Oligo (dT) súper-paramagnéticos, añadiendo posteriormente la mezcla a una columna imantada, por lo que el ARN quedó retenido gracias a las fuerzas de atracción electromagnéticas que se establecen con el *ThermoMACS™ Separator*. Sobre esta columna se realizaron diferentes lavados, y posteriormente, la transcripción inversa para la síntesis de ADNc. Una vez sintetizado el ADNc se realizaron varios lavados tras los cuales se eluyó finalmente el ADNc. Por tanto, la totalidad del proceso se realizó en la misma columna, lo cual minimiza la probabilidad de que exista contaminación.

Este método de extracción de ARNm no incluye tratamiento enzimático con *Dnase* para la eliminación de los restos de ADN genómico que puedan quedar tras el aislamiento de ARNm. Por tanto, en los casos en los que la seguridad de la ausencia de ADN genómico antes de la síntesis de

ADNc es esencial, como en el caso de la cuantificación de la expresión de genes que contienen un sólo exón, se utilizó *RNAeasy Micro kit* (Qiagen, Alemania) para la extracción de ARNm y *RT² First Strand kit* (Qiagen, Alemania) para la síntesis de ADNc siguiendo las recomendaciones del fabricante.

3.4.2 Estudios de expresión - PCR cuantitativa a tiempo real

La PCR a tiempo real es una técnica basada en la detección y cuantificación de marcadores fluorescentes a lo largo de la reacción de PCR. Esto permite conocer la cantidad de fluorescencia emitida durante la fase exponencial de la reacción donde el aumento significativo del producto de PCR se correlaciona con la cantidad inicial de ADNc. Para los estudios de expresión con ADNc procedente de cultivos de CPEs humanas, se utilizaron muestras de 14 pacientes HSCR y 5 individuos controles, realizando el análisis por triplicado.

Para los estudios de expresión en cultivos de NLBs realizados se emplearon dos tipos de métodos, SYBR Green y Taqman, utilizando los equipos 7500 y 7900HT *Fast Real-Time PCR System* (Life Technologies, USA).

Por un lado, se utilizó *SYBR Green* (BioRad, USA) usando el termociclador 7500HT *Fast Real-Time PCR System*. Este compuesto detecta ADN bicatenario, ya que se une al ADN intercalándose en la doble hélice, generando fluorescencia cuando es excitado por una fuente de luz. El ARNm extraído se trataba con *Dnase* previamente a la síntesis de ADNc para eliminar posibles restos de ADN genómico y posteriormente se comprobó la ausencia de ADN genómico en estas muestras, asegurándose que los resultados obtenidos en estos genes deriven del ADNc. Cada reacción contaba con un volumen final de 20µl, donde 5µl eran 100ng de ADNc, 10µl *SsoAdvanced universal SYBR® Green supermix 2x* (BioRad, USA), 1ul de cada cebador a 10µM, completando finalmente los 20µl con agua. Las secuencias de los cebadores utilizados se muestran en la Tabla 9. Las condiciones de amplificación y el resto de componentes se muestran en las Tabla 10. Finalmente, mediante el uso de cebadores específicos del gen de interés, nos dio un valor Ct (Ciclo umbral), siendo éste el número de ciclos a partir del cual la fluorescencia generada supera un umbral establecido para evitar señal procedente de ruido de fondo. Por tanto a menor valor de Ct mayor será la expresión del gen de interés. Sólo se consideró expresión positiva cuando el valor de Ct es menor a 35, por tanto todo Ct que supere ese valor fue considerado como no expresión siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Tabla 9. Secuencias de los cebadores utilizados con el método SYBR Green

Gen	Secuencia Forward (5'-3')	Secuencia Reverse (5'-3')	Tamaño (pb)
<i>RNA45S5</i>	GAAACCTTCCGACCCCTCTC	CGCTAAGAGTCGTACGAGGT	178
<i>CH507-528H12.1</i>	CCCAACTTGACCACCCAAAG	CTGGGCGACAAGAGTGAAAC	213
<i>CH507-513H4.4</i>	CGCTCCACCAACTAAGAACG	GGGGAGTATGGTTGCAAAGC	191
<i>LINC01603</i>	CAATCTGGAGAGAAATGTGTGTT	CCCTGCAGGCCATAATCATC	179
<i>RP11-220D10.1</i>	TCTCCAAGGACAAACAGGC	GCAGCTTTCCTCATGGCG	115
<i>P53</i>	TGGCCATCTACAAGCAGTCA	GGTACAGTCAGAGCCAACCT	212
<i>P21</i>	CAGCAGAGGAAGACCATGTG	GGCGTTTGGAGTGGTAGAAA	153
<i>p21</i>	GTACTTCCTCTGCCCTGCTG	TCTGCGCTTGGAGTGATAGA	173
<i>Puma</i>	GCCCAGCAGCACTTAGAGTC	TGTCGATGCTGCTCTTCTTG	191
<i>Bax</i>	TGCAGAGGATGATTGCTGAC	GATCAGCTCGGGCACTTTAG	173
<i>Mdm2</i>	TGCAAGCACCTCACAGATTC	ACACAATGTGCTGCTGCTTC	188
<i>Casp6</i>	GCAGAAGAACTCCTGCTCAAA	TTTGAACAAGCCAGTCAACG	156
<i>Casp8</i>	AACTGCGTTTCCTACCGAGA	GCATCTGCTTTCCTTGTTTC	169

Tabla 10. Condiciones de amplificación PCR cuantitativa por el método SYBR Green.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Rampa	50	2'	
Desnaturalización inicial	95	10'	
Desnaturalización	97	15''	40
Hibridación	59	1'	

Los valores de expresión se analizaron usando el método $\Delta\Delta C_t$ de cuantificación relativa [Livak y Schmittgen, 2001], donde los genes son normalizados frente a un control endógeno, siendo éste un gen que se expresa de manera constitutiva en la células, obteniendo el valor de expresión relativa representado como $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (abundancia relativa). Se utilizó como control endógeno de expresión el gen *BETA-ACTINA* o *GAPDH* y adicionalmente un ADNc de cerebro comercial (cDNA, from adult human normal brain tissue, Life Technologies, USA) como control positivo para medir la eficiencia de la reacción.

El termociclador 7900HT Fast Real-Time PCR System se usó para las placas customizadas *TaqMan® Array Plate* (TLDA) (Life Technologies, USA). Estas placas permiten el análisis de expresión simultáneo de 96x4 genes diferentes. En este caso se analizaron 32 genes por triplicado en 4 individuos por cada placa (tres muestras de pacientes y una de control), 30 correspondientes a genes problema y 2 a genes utilizados como control endógeno (*GADPH* y *S18*) (Figura 17).

La cantidad usada de ADNc para el análisis de expresión de 96 genes (32x3) en cada individuo fue de 200ng en total. La reacción fue completaba con *TaqMan® Universal PCR Master Mix* (2x) (Life Technologies, USA), con las siguientes condiciones de amplificación (Tabla 11)

Tabla 11. Condiciones de amplificación PCR cuantitativa por el método TaqMan.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Rampa	50	2'	
Desnaturalización inicial	94,5	10'	
Desnaturalización	97	30''	40
Hibridación	59,7	1'	

Para el procesamiento de los datos, se utilizó el software de *Life Technologies SDS 2.1* basado en el método $\Delta\Delta C_t$ de cuantificación relativa [Livak y Schmittgen, 2001]. Los datos obtenidos se analizaron mediante el programa *RQ Manager 1.2* (Life Technologies, USA) para obtener los valores crudos de C_t , aplicando una línea base automática y el umbral definido como automático. Se consideró como expresión positiva exclusivamente aquellos genes en los cuales el C_t es menor o igual a 32, siguiendo las recomendaciones del fabricante. En este caso el control endógeno usado fue *S18*.

Replicas																								Puertos
1	GAPDH	DPP9	MYO7A	LITAF	CDK5RAP2	KPNA1	ANO2	CHL1	LIMD1	CYR61	SULF1	GPHN	SF1	BBX	DOPEY2	PPP2R2B	SMO	EED	C10ORF67	TMEM125	KIAA0825	LY75	DRG1	EIF4ENIF1
	RAB10	MYDGF	NEDD4L	NEDD4	STAT3	NEUROG1	ADAM8	S18	GAPDH	DPP9	MYO7A	LITAF	CDK5RAP2	KPNA1	ANO2	CHL1	LIMD1	CYR61	SULF1	GPHN	SF1	BBX	DOPEY2	PPP2R2B
	SMO	EED	C10ORF67	TMEM125	KIAA0825	LY75	DRG1	EIF4ENIF1	RAB10	MYDGF	NEDD4L	NEDD4	STAT3	NEUROG1	ADAM8	S18	GAPDH	DPP9	MYO7A	LITAF	CDK5RAP2	KPNA1	ANO2	CHL1
	LIMD1	CYR61	SULF1	GPHN	SF1	BBX	DOPEY2	PPP2R2B	SMO	EED	C10ORF67	TMEM125	KIAA0825	LY75	DRG1	EIF4ENIF1	RAB10	MYDGF	NEDD4L	NEDD4	STAT3	NEUROG1	ADAM8	S18
2	GAPDH	DPP9	MYO7A	LITAF	CDK5RAP2	KPNA1	ANO2	CHL1	LIMD1	CYR61	SULF1	GPHN	SF1	BBX	DOPEY2	PPP2R2B	SMO	EED	C10ORF67	TMEM125	KIAA0825	LY75	DRG1	EIF4ENIF1
	RAB10	MYDGF	NEDD4L	NEDD4	STAT3	NEUROG1	ADAM8	S18	GAPDH	DPP9	MYO7A	LITAF	CDK5RAP2	KPNA1	ANO2	CHL1	LIMD1	CYR61	SULF1	GPHN	SF1	BBX	DOPEY2	PPP2R2B
	SMO	EED	C10ORF67	TMEM125	KIAA0825	LY75	DRG1	EIF4ENIF1	RAB10	MYDGF	NEDD4L	NEDD4	STAT3	NEUROG1	ADAM8	S18	GAPDH	DPP9	MYO7A	LITAF	CDK5RAP2	KPNA1	ANO2	CHL1
	LIMD1	CYR61	SULF1	GPHN	SF1	BBX	DOPEY2	PPP2R2B	SMO	EED	C10ORF67	TMEM125	KIAA0825	LY75	DRG1	EIF4ENIF1	RAB10	MYDGF	NEDD4L	NEDD4	STAT3	NEUROG1	ADAM8	S18
3	GAPDH	DPP9	MYO7A	LITAF	CDK5RAP2	KPNA1	ANO2	CHL1	LIMD1	CYR61	SULF1	GPHN	SF1	BBX	DOPEY2	PPP2R2B	SMO	EED	C10ORF67	TMEM125	KIAA0825	LY75	DRG1	EIF4ENIF1
	RAB10	MYDGF	NEDD4L	NEDD4	STAT3	NEUROG1	ADAM8	S18	GAPDH	DPP9	MYO7A	LITAF	CDK5RAP2	KPNA1	ANO2	CHL1	LIMD1	CYR61	SULF1	GPHN	SF1	BBX	DOPEY2	PPP2R2B
	SMO	EED	C10ORF67	TMEM125	KIAA0825	LY75	DRG1	EIF4ENIF1	RAB10	MYDGF	NEDD4L	NEDD4	STAT3	NEUROG1	ADAM8	S18	GAPDH	DPP9	MYO7A	LITAF	CDK5RAP2	KPNA1	ANO2	CHL1
	LIMD1	CYR61	SULF1	GPHN	SF1	BBX	DOPEY2	PPP2R2B	SMO	EED	C10ORF67	TMEM125	KIAA0825	LY75	DRG1	EIF4ENIF1	RAB10	MYDGF	NEDD4L	NEDD4	STAT3	NEUROG1	ADAM8	S18
4	GAPDH	DPP9	MYO7A	LITAF	CDK5RAP2	KPNA1	ANO2	CHL1	LIMD1	CYR61	SULF1	GPHN	SF1	BBX	DOPEY2	PPP2R2B	SMO	EED	C10ORF67	TMEM125	KIAA0825	LY75	DRG1	EIF4ENIF1
	RAB10	MYDGF	NEDD4L	NEDD4	STAT3	NEUROG1	ADAM8	S18	GAPDH	DPP9	MYO7A	LITAF	CDK5RAP2	KPNA1	ANO2	CHL1	LIMD1	CYR61	SULF1	GPHN	SF1	BBX	DOPEY2	PPP2R2B
	SMO	EED	C10ORF67	TMEM125	KIAA0825	LY75	DRG1	EIF4ENIF1	RAB10	MYDGF	NEDD4L	NEDD4	STAT3	NEUROG1	ADAM8	S18	GAPDH	DPP9	MYO7A	LITAF	CDK5RAP2	KPNA1	ANO2	CHL1
	LIMD1	CYR61	SULF1	GPHN	SF1	BBX	DOPEY2	PPP2R2B	SMO	EED	C10ORF67	TMEM125	KIAA0825	LY75	DRG1	EIF4ENIF1	RAB10	MYDGF	NEDD4L	NEDD4	STAT3	NEUROG1	ADAM8	S18

Figura 17. Placa Customizada TaqMan® Array Plate con formato de 384 pocillos. Diseño de la placa TaqMan® Array Plate para realizar el análisis del patrón de expresión de 32 genes por triplicado en cuatro individuos diferentes (3 pacientes HSCR y 1 control).

3.4.3 Silenciamiento mediante ARN *short hairpin* (shARN) expresados por vectores lentivirales

La expresión de *Dnmt3b* fue silenciada en cultivos de NLBs procedentes de ratón usando el método de silenciamiento génico post-transcripcional de ARNi utilizando partículas lentivirales para su introducción en el núcleo de la célula. Estos vectores lentivirales expresan constitutivamente pequeñas moléculas de ARN que espontáneamente forman una estructura de horquilla (shARN). Estos shARNs son reconocidos y procesados por la vía de los ARNi, formando pequeños ARNi activos (siARN) que provocan la degradación del ARNm citoplasmático con secuencia complementaria y por tanto reduciendo la expresión del gen (Lambeth y cols., 2012) (Figura 18).

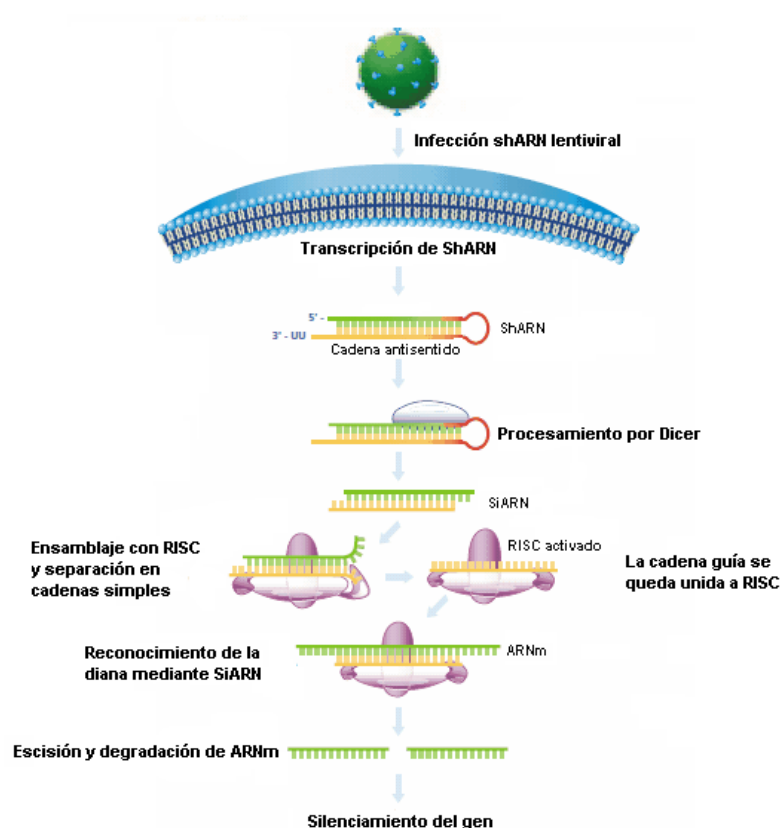


Figura 18. Silenciamiento génico mediado por shARN. La transcripción del shARN se produce en el núcleo donde forma de manera espontánea una horquilla de ARN. Esta horquilla se transporta al citoplasma donde entra en la vía de los ARNi cuando es escindido por Dicer para generar siARNs activos. Los siARNs son reconocidos por *RNAi-Induced Silencing Complex* (RISC), lo que provoca el desenrollamiento de la doble cadena de los siARNs y la activación de este complejo. RISC activado y asociado a la cadena antisentido del siARN, se une a su ARNm diana por homología para su escisión y subsecuente degradación, provocando el silenciamiento del gen.

El uso de partículas lentivirales para la introducción de shARNs en las células es un método eficiente para el silenciamiento de la expresión de genes en células de mamíferos debido a que provoca un silenciamiento estable en una variedad de tipos celulares, siendo además efectivo tanto en células en división como en las que no se están dividiendo, así como en células madre y su progenie diferenciada [Rubinson y cols., 2003]. Para el estudio se utilizaron vectores lentivirales que expresaban shARN contra el ARNm de *Dnmt3b* en ratón “*DNMT3B MISSION shARN Lentiviral Transduction Particles*” (Sigma Aldrich, USA), existiendo shARN con distintas secuencias dirigidas contra distintas regiones de DNMT3b (*Dnmt3b-shARN1*, *Dnmt3b-shARN2*, *Dnmt3b-shARN3*, *Dnmt3b-shARN4*) (Tabla 12), para todas ellas se comprobó la efectividad de la reducción de *Dnmt3b* mediante el método *SYBR Green* usando una multiplicidad de infección (MOI) de 1,5. La mayor reducción de expresión de *Dnmt3b* en cultivos de NLBs de ratón se obtuvo con *Dnmt3b-shARN1*. Como control negativo del silenciamiento se usó la partícula lentivirales con el shARN sin coincidencia con ninguna diana, *MISSION® pLKO.1-puro Non-Target shARN Control Transduction Particles* (Sigma Aldrich, USA), siendo además necesario para la correcta interpretación de los resultados provocados en las células por dicho silenciamiento y no por el efecto de la partícula lentiviral con el shARN en sí.

Tabla 12. Detalle de las moléculas *Dnmt3b*-shARN disponibles para ratón. CDS: Región codificante del gen.

ID	Región	Secuencia
<i>Dnmt3b-shRNA1</i>	3'UTR	CCGGCCAGGAGTATTTGAAGATGATCTCGAGATCATCTTCAAATACTCCTGGTTTTTG
<i>Dnmt3b-shRNA2</i>	CDS	CCGGGCTCTGATATTCTAATGCCAACTCGAGTTGGCATTAGAATATCAGAGCTTTTTG
<i>Dnmt3b-shRNA3</i>	CDS	CCGGCAAGAAAGACATCTCAAGATTCTCGAGAATCTTGAGATGTCTTTCTTGTTTTTG
<i>Dnmt3b-shRNA4</i>	CDS	CCGGGCACTTTAATCTGGCTACCTTCTCGAGAAGGTAGCCAGATTAAAGTGCTTTTTG

Por tanto los cultivos de CPEs se establecieron en tres grupos: cultivo sin infectar (Control); cultivo shARN sin diana (LV-) y cultivo *Dnmt3b*-shARN1 (LV1). Los pasos para llevar a cabo el silenciamiento de *Dnmt3b* fueron los siguientes:

- *Conteo celular*: A las 24 horas de la obtención de los cultivos de las CPEs de ratón se obtuvo el número de células vivas totales en el cultivo mediante el conteo de las células usando la Cámara de Neubauer.
- *Cultivo celular*: Las CPEs se cultivaron con una densidad de 2×10^5 células/pocillo en placas

Ultra-Low attachment Surface (Corning® Costar® *Ultra-Low attachment 6 well plate*, Sigma Aldrich, Alemania).

- *Infección*: Las células se infectaron añadiendo LV1 o LV- a un MOI de 1,5.
- *Mantenimiento*: Las células se mantuvieron en cultivo in vitro durante 24 horas o 7 días (7 div.) con el objetivo de establecer dos condiciones (corto y largo plazo) en los ensayos de expresión génica. Además, el periodo de 7div. fue necesario para que la apropiada formación de NLBs tuviera lugar, hecho esencial para el desarrollo de los ensayos posteriores de medición de la proliferación mediante los parámetro de tamaño y número de NLBs.
- *Comprobación de la eficiencia del silenciamiento*: La extracción del ARNm y la síntesis de ADNc se realizó utilizando el *μMACS™ Onestep cDNA Kit* (Miltényi Biotec, Alemania). Posteriormente la bajada de expresión de *Dnmt3b* se comprobó mediante PCR cuantitativa a tiempo real usando el método *SYBR Green*.

3.4.3.1 Ensayos de proliferación celular - Conteo y medición de tamaño de NLBs

Para determinar el número de NLBs formadas a partir de cultivos de CPEs de ratón con una densidad de 2×10^5 células/pocillo se llevó a cabo el conteo de dichas NLBs a los 7 div mediante microscopía de fase (IX71, Olympus, Japan). Posteriormente, con el objetivo de comprobar el tamaño de las NLBs formadas, se tomaron imágenes de 20 campos/pocillo de dichos cultivos. El área de las NLBs se estimó usando el sistema de análisis *Microimage* de Olympus. Al menos se midió el área de 60 NLBs por condición, tras lo cual se obtuvo el promedio del área por cada condición testada en los cultivos de CPEs.

3.4.3.2 Ensayos de diferenciación celular – Citometría de flujo

Con el objetivo de conocer la proporción de distintos fenotipos celulares de interés presentes en cultivos de NLBs en las diferentes condiciones establecidas se comprobó el porcentaje de dichos fenotipos celulares mediante citometría de flujo. Esta técnica de análisis celular permite examinar un gran número de células de manera individual en una corriente de flujo de un fluido. La suspensión de células se inyecta con un fluido externo a la muestra formándose una corriente continua de células individuales. Los láseres se disponen perpendicularmente a las células alineadas, incidiendo sobre estas y excitando el fluorocromo con el láser correspondiente, lo que

permite la identificación de antígenos celulares mediante técnicas de inmunofluorescencia. Los fenotipos fueron analizados mediante marcadores determinados, que fueron los siguientes: precursor neural indiferenciado (Nestina); precursor entérico derivado de la cresta neural indiferenciado (p75) y neurona (β III Tubulina) (Tabla 13 y Tabla 14). El protocolo para el marcaje de las células procedentes de las NLBs de los cultivos sometidos a las distintas condiciones fue el siguiente:

- *Disgregación celular*: Las NLBs se disociaron enzimáticamente con Tripsina al 0,05% con el objetivo de obtener una suspensión de células individuales.
- *Fijación*: Posteriormente se realizó la fijación a temperatura ambiente de la suspensión celular con paraformaldehído al 4% en 0,1 mol/l de PBS durante 30 minutos. Este paso es esencial, ya que el marcaje a realizar es intracelular.
- *Bloqueo*: Una vez fijadas, se procedió al bloqueo para evitar reacciones inespecíficas con suero fetal bovino al 2,5% en PBS a temperatura ambiente durante 1 hora.
- *Anticuerpo primario*: Tras el bloqueo se realizó la incubación con los anticuerpos primarios a 4°C durante 16 horas. Los anticuerpos primarios utilizados así como las diluciones utilizadas se describen con detalle en la tabla 13.
- *Anticuerpo secundario*: La incubación con los anticuerpos secundarios se realizó a temperatura ambiente durante 1 hora. Los anticuerpos secundarios utilizados se detallan en la tabla 14.

Tabla 13. Anticuerpos primarios utilizados.

Antisuero	Hospedador	Variante	Dilución	Células identificadas	Fuente
Nestina	Cabra	Policlonal	1:1000	Precursor neural indiferenciado	Santa Cruz Biotechnology, Inc
P75	Conejo	Policlonal	1:500	Precursor entérico derivado de la cresta neural indiferenciado	Abcam, Reino Unido
β III Tubulina	Ratón	Monoclonal	1:500	Neurona	Merck Millipore, Alemania

Tabla 14. Anticuerpos secundarios utilizados.

Reactividad	Fluorescencia	Ig	Dilución	Fuente
Cabra	Cy5	G	1:200	Jackson Immuno Research Laboratories Inc, Reino Unido
Conejo	Alexa Fluor 568	G	1:200	Life Technologies, USA
Ratón	Cy2	G	1:200	Jackson Immuno Research Laboratories Inc, Reino Unido

Los datos sobre la proporción de células positivas del cultivo para cada marcador se obtuvieron usando el citómetro analizador *LRS II Fortessa* (Becton Dickinson, USA). Este citómetro posee un total de cuatro láseres, lo que permite aumentar la cantidad de anticuerpos fluorescentes utilizados para el marcado, haciendo posible una identificación de la población de interés a través de sus marcadores fenotípicos con mayor precisión. El análisis de los datos recopilados por citometría de flujo se analizaron utilizando el *software BD FACSDiva™* (BD Biosciences, USA). Dicho análisis se realizó teniendo en cuenta tanto el marcaje simple, Nestina+, p75+ y β III Tubulina+, como la combinación de estos marcadores en la misma célula.

3.4.3.3 Western-Blot

El ensayo de Western-Blot es una técnica que se realiza con el objetivo de detectar determinadas proteínas mediante anticuerpos específicos. La técnica consta de varias etapas:

- *Aislamiento de proteínas*: Las NLBs procedentes de los cultivos con las distintas condiciones establecidas se lisaron a 4°C durante 30 minutos en rotación usando el buffer de lisis *Radioimmunoprecipitation assay buffer* (RIPA), al cual se le adicionaron los inhibidores de proteasa y fosfatasa (Roche, Alemania). Una vez obtenido el lisado se centrifugó a máxima velocidad (16000g) durante 15 minutos y se recogió el sobrenadante el cual contenía la solución de proteínas.
- *Cuantificación de proteínas*: La concentración de proteínas se determinó mediante el método de cuantificación *Bradford* (Bio-Rad, USA). Este método se basa en la unión del colorante *Coomassie Brilliant Blue G-250* a las proteínas, siendo detectadas mediante espectrofotometría a 595 nm. Para ello, previamente a la detección de las proteínas de interés se realizó una recta patrón con 8 concentraciones distintas usando diluciones de albúmina de suero bovino en buffer de lisis sobrante, para posteriormente poder determinar la concentración de proteínas de las muestras mediante el espectrofotómetro

SmartSpectTM 3000 (Bio-Rad, USA) (Tabla 15).

- *Electroforesis*: La misma cantidad de proteínas para cada extracto celular (20 µg) se separó en función de su peso molecular mediante electroforesis en gel de acrilamida (SDS-PAGE) usando los genes *Mini-PROTEAN® TGX* (Bio-Rad, USA). Se usó buffer TGS (*Tris/Glycine/SDS*) a 1x (Bio-Rad, USA) para la electroforesis.
- *Transferencia*: Las proteínas separadas por electroforesis se transfirieron a la membrana *Immun-Blot® PVDF* (Bio-Rad, USA), inmovilizándolas. Para ello se usó buffer TG (*Tris/Glycine*) 1x diluido a partir del buffer TG 10x (Bio-Rad, USA) usando las indicaciones del fabricante.
- *Bloqueo*: Para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos a la membrana se incubó la membrana con una solución al 5% de leche desnatada en polvo disuelta en buffer TBS (*Tris Buffered Saline*) 1x (Bio-Rad, USA) con 0,1% *Tween20* (T-TBS). Dicha incubación se hizo a temperatura ambiente durante 1 hora.
- *Anticuerpo primario*: Para la inmunodetección se incubó la membrana a 4°C en agitación durante 16 horas con los anticuerpos primarios policlonales detallados en la tabla 16.
- *Anticuerpo secundario*: Una vez que el anticuerpo primario está unido a las proteínas de interés y tras una serie de lavados con T-TBS, se incubó la membrana con el anticuerpo secundario IgG vinculado con peroxidasa de rábano (*Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody* o *Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody*, Cell Signaling Technology, USA) para la detección quimioluminiscente de las bandas. En ambos casos se usó una dilución 1:2000.
- *Revelado*: Una vez concluidas las incubaciones con los anticuerpos, la membrana se incubó con la solución reactiva proporcionada en el kit *ChemiDoc HRS* (Bio-Rad, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante. Dicha solución contenía los sustratos de la peroxidasa de rábano que permitieron visualizar las bandas de proteínas en el *ChemiDocTM XRS+ Imaging System* (Biorad, USA).
- *Análisis*: La cuantificación de las bandas se llevó a cabo mediante fotodensitometría con el software *Image Lab 3.0* (Bio-Rad, USA).

Tabla 15. Concentraciones de la recta patrón utilizada para la medición de las proteínas.

Patrón	Concentración (mg/ml)
1	2
2	1,5
3	1
4	0,75
5	0,5
6	0,25
7	0,125
8	0

Tabla 16. Anticuerpos primarios utilizados para la detección de proteínas de interés mediante Western-Blot.

Antisuerro	Hospedador	Dilución	Fuente
P44/42 MAPK (ERK 1/2)	Conejo	1:1000	Cell Signaling Technology, USA
p-P44/42 MAPK (ERK 1/2) (Thr202/Tyr204)	Conejo	1:1000	Cell Signaling Technology, USA
AKT	Conejo	1:1000	Cell Signaling Technology, USA
p-AKT (Ser437)	Conejo	1:1000	Cell Signaling Technology, USA
STAT3	Ratón	1:1000	Cell Signaling Technology, USA
p-STAT 3 (Tyr705)	Ratón	1:1000	Cell Signaling Technology, USA
Bcl-xL	Conejo	1:2000	Cell Signaling Technology, USA
P53	Ratón	1:1000	Cell Signaling Technology, USA
Beta actina	Ratón	1:2000	Cell Signaling Technology, USA

3.4.4 Inmunoprecipitación de cromatina y secuenciación (ChIP-Seq)

En cada estado celular existen numerosas proteínas unidas al ADN que regulan la expresión génica. ChIP-Seq es una técnica que combina inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) con secuenciación masiva. En esta técnica primero se realiza una inmunoprecipitación de ADN y seguidamente se efectúa la secuenciación masiva de los sitios enriquecidos, lo que permite identificar a nivel genómico los fragmentos diana de proteínas regulatorias de interés asociadas al ADN (Figura 19).

La técnica del Chip-Seq consta de varios pasos: Primero la cromatina fijada es sonicada para obtener fragmentos de un tamaño apropiado para la construcción de librerías adecuadas para la generación óptima de clústeres a la hora de secuenciar (200-300pb). Una vez fragmentado el ADN se purifica la cromatina con y sin inmunoprecipitar (ChIP y su correspondiente Input, respectivamente). Posteriormente se elaboran las librerías con estos fragmentos de ADN, seleccionando los fragmentos con el tamaño adecuado, los cuales se secuencian obteniendo las lecturas. Estas lecturas se mapean con respecto al genoma de referencia que en este caso fue el de ratón mm9. Las regiones genómicas que estén significativamente enriquecidas en las lecturas del ChIP comparadas con las lecturas de su correspondiente Input se detectan como picos (el resto de regiones se consideran como regiones no específicas o *background*). Estos picos representan a los

distintos sitios de unión en el ADN de la proteína, siendo en este caso las de DNMT3b.

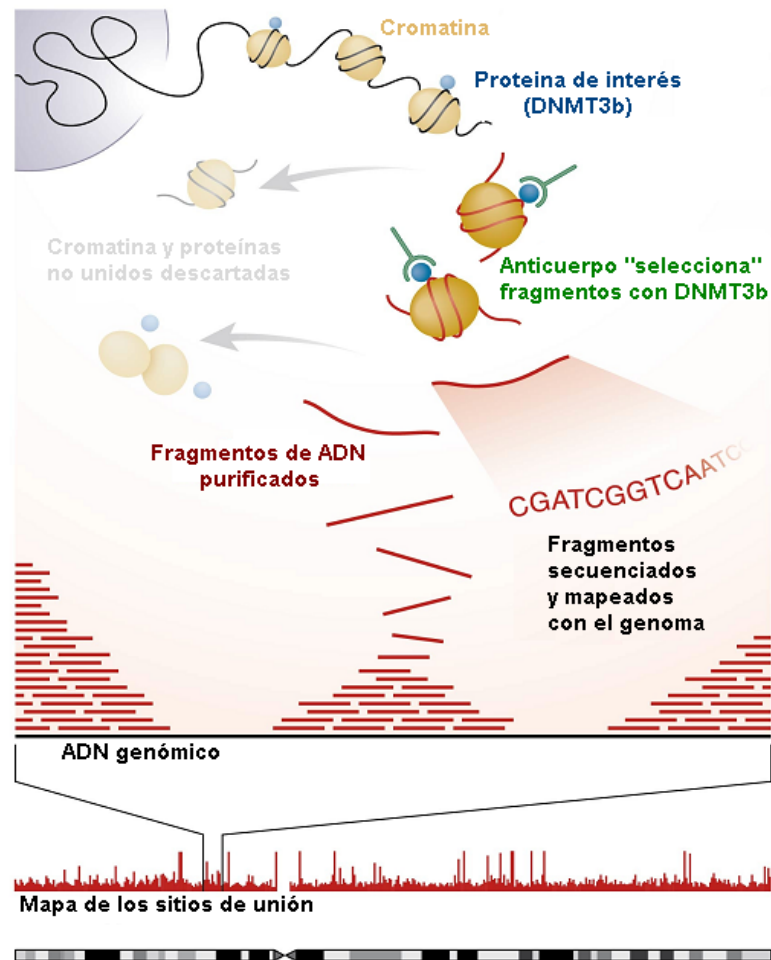


Figura 19. Representación esquemática de la técnica ChIP-Seq. La cromatina fijada es sonicada e inmunoprecipitada con el anticuerpo de interés. Estos fragmentos son secuenciados y mapeados con un genoma de referencia, detectándose las regiones significativamente enriquecidas en la muestra ChIP con respecto a la del Input y las cuales representan las regiones diana de la proteína de interés.

3.4.4.1 Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP)

El primer paso de la técnica de ChIP-Seq es obtener mediante inmunoprecipitación las regiones de ADN diana de la proteína de interés. Para ello, los pasos a seguir son los siguientes:

- **Fijación:** Las CPEs aisladas del intestino de ratón (aproximadamente 10^6 células/ChIP) se fijaron con formaldehído al 1%, provocando la asociación covalente al ADN de las proteínas que ya estaban unidas al ADN mediante uniones no covalentes.

- *Fragmentación del ADN*: Posteriormente el ADN se fraccionó con ultrasonidos usando el sistema Bioruptor (Diagenode, USA). Se realizaron 6 ciclos de 15 minutos a máxima potencia para generar fragmentos de ADN con 200-1000 pb de tamaño.
- *ChIP*: La técnica de inmunoprecipitación se llevó a cabo con el kit *Magna Chip Hisens* (Millipore, USA), siguiendo las indicaciones del fabricante. Este kit se basa en la unión previa del anticuerpo a bolas magnéticas. El anticuerpo utilizado fue *anti-Dnmt3b antibody ChIP Grade* (Abcam, USA). La proteína DNMT3b junto a sus regiones diana se unen al complejo formado por el anticuerpo y las bolas magnéticas, lo que permitió descartar posteriormente de manera sencilla aquello que no se haya unido específicamente, reduciendo el ruido de fondo. Una vez obtenida la proteína de interés unida a sus regiones diana en el ADN, se eliminaron enzimáticamente las proteínas usando proteinasa K. Finalmente obtuvimos una solución de ADN que contenía todas las regiones diana de la proteína DNMT3b (ChIP) en las CPEs de ratón. Previamente a la inmunoprecipitación se mantuvo el 10% de las muestras sin inmunoprecipitar como control (Input). Un esquema de todo este proceso se muestra en la Figura 20.
- *Cuantificación*: ChIP e Input se cuantificaron usando el kit *Quant-iT Picogreen dsDNA* (ThermoFisher Scientific, USA). El colorante Picogreen permite cuantificar el ADN bicatenario de forma específica.

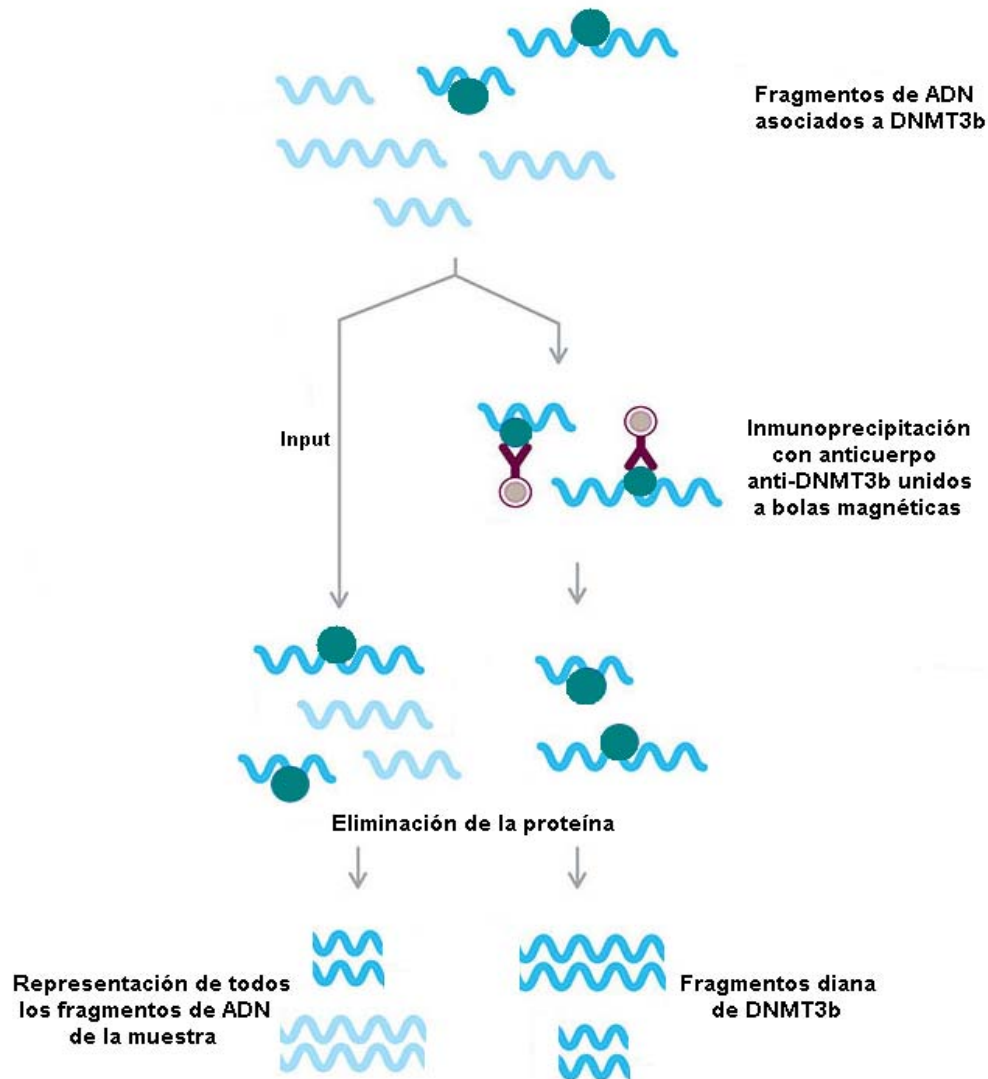


Figura 20. Representación esquemática de ChIP.

3.4.4.2 Preparación de librerías

Una vez que se tuvo las regiones diana de DNMT3b, se prosiguió con la preparación de librerías tanto de las muestras Input como de ChIP para poder llevar a cabo la secuenciación de los fragmentos con el tamaño requerido. Para ello se utilizó el kit *TruSeq ChIP-Seq DNA sample prep* (Illumina, USA), siguiendo las indicaciones del fabricante. Cada librería se elaboró con adaptadores que incluían distintas secuencias de 6 nucleótidos que permiten la identificación posterior de cada una de las muestras tras la secuenciación. Los pasos llevados a cabo se muestran en la Figura 21.

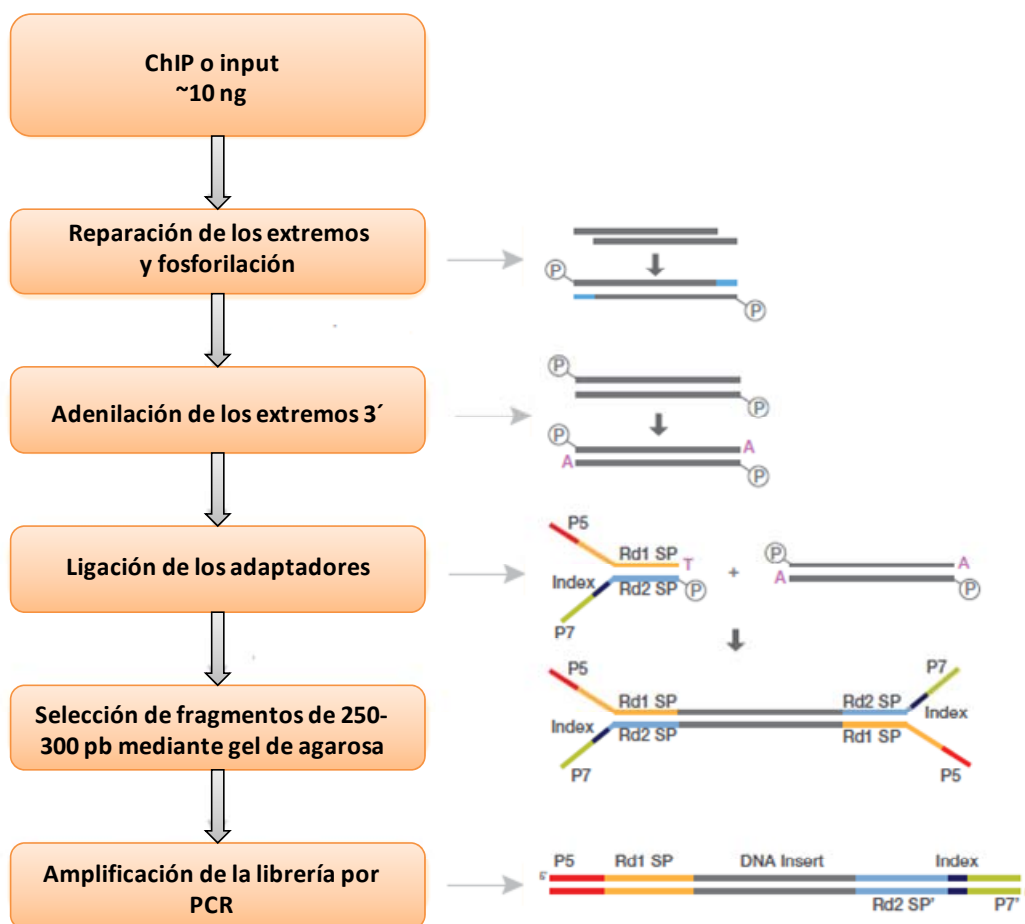


Figura 21. Representación esquemática del procedimiento de preparación de librerías.

3.4.4.3 Validación librerías

Previamente a la secuenciación son necesarios realizar dos ensayos de validación para confirmar la validez de las librerías obtenidas. 1) Confirmación del tamaño adecuado de los fragmentos de ADN que componen las librerías (200-300 pb) y de la ausencia de dímeros de cebadores formados durante la PCR. Este ensayo se realiza utilizando el kit *High Sensitivity DNA* (Agilent, USA) en el equipo *2100 Bioanalyzer* (Agilent, USA). 2) Cuantificación mediante PCR cuantitativa a tiempo real utilizando el kit *Library Quantification* (Kapa Biosystems). Dicho kit contiene cebadores específicos para los adaptadores utilizados en la elaboración de librerías, por lo que sólo se cuantifican aquellos fragmentos que contengan los adaptadores, y por tanto sólo aquellos fragmentos que se van a secuenciar. Todo ello permite la correcta cuantificación de cada librería, hecho necesario para poder realizar las diluciones adecuadas y obtener la concentración de 4nM para finalmente unificarlas y prepararlas para la secuenciación como se describe a

continuación.

3.4.4.4 Secuenciación de nueva generación

Las librerías se prepararon para su secuenciación utilizando el kit *Miseq Reagent V2 (50 cycles)* (Illumina, USA). Una vez obtenida la concentración de 4nM de cada librería, se unificaron todas (Pool) y se procedió a su desnaturalización utilizando NaOH 0,2N, ya que la secuenciación se lleva a cabo con fragmentos de ADN de cadena simple. Finalmente se diluyó el conjunto de librerías a 8pM y se procedió a secuenciar usando el sistema *MiSeq* (Illumina, USA).

3.4.4.5 Análisis de los resultados de secuenciación

Los datos obtenidos de la secuenciación se analizaron usando las siguientes herramientas bioinformáticas:

- *FastQC*: Herramienta utilizada para realizar un análisis exhaustivo de calidad de las lecturas obtenidas adicionalmente al que ofrece el secuenciador *MiSeq*. Herramienta disponible en la plataforma Galaxy (<https://usegalaxy.org>).
- *Bowtie*: Herramienta que permite la alineación de las secuencias obtenidas con un genoma de referencia (mapeo), que en este caso fue el genoma de ratón mm9. Descartadas las secuencias no mapeadas, se normalizó el número de lecturas mapeadas de los ChIPs e Inputs. Herramienta disponible en la plataforma Galaxy (<https://usegalaxy.org>).
- *Model-based Analysis of ChIP-Seq (MACS)*: Permite la predicción de los sitios de unión de la proteína en estudio a través de la identificación de las regiones significativamente más enriquecidas en el ChIP con respecto al input (picos). Además, toda región identificada como pico en el ChIP debe estar también presente en el input, en caso contrario dicha región es descartada. Se utilizó dicha herramienta usando los parámetros establecidos por defecto en la misma, donde el valor p máximo permitido es 0,00001. Herramienta disponible en la plataforma *Galaxy/Cistrome* (<http://cistrome.org/ap/>).
- *Cluster*: Herramienta utilizada para combinar los picos procedentes de distintas librerías cuyas regiones genómicas coincidan en al menos 1 pb. Finalmente obtenemos un intervalo único que contiene dichas regiones solapantes, siendo descartadas aquellas que no coincidan con ninguna de las regiones presentes en las otras librerías analizadas. Se

utilizaron los parámetros establecidos por defecto para dicha herramienta, la cual está disponible en la plataforma Galaxy/Cistrome (<http://cistrome.org/ap/>).

- *Beta-minus; Peak Annotation and Visualization (PAVIS); Peak Assignment and Profile SearchTool (PAPST)*: Distintas herramientas se utilizaron para la predicción de los genes diana en base a los picos obtenidos. Cada una de ellas ofrece diferentes datos sobre las regiones dianas, además de basarse en diferentes parámetros para nombrar los genes diana. Se usaron estos tres programas de manera simultánea para restringir el número de genes diana resultantes.
 - *Beta-minus*: Predice los genes diana basándose en la distancia entre el sitio de unión y el inicio de transcripción del gen. Se usaron los parámetros por defecto establecidos (100 kb). Beta minus proporciona una lista de los genes diana ordenada por puntuación descendente (*Score*) basándose en la distancia del pico al inicio de transcripción del gen, además de otros datos distribuidos en columnas:

<i>Chrome</i>	<i>start</i>	<i>end peak</i>	<i>refseqID</i>	<i>Gene_Symbol</i>	<i>distance</i>	<i>score</i>
---------------	--------------	-----------------	-----------------	--------------------	-----------------	--------------

Las primeras tres columnas ofrecen información de los picos, la cuarta y la quinta son los genes diana y la sexta la distancia al pico. La última columna muestra el score ordenado de los genes [Wang y cols., 2013]. Esta herramienta está disponible en la plataforma Galaxy/Cistrome (<http://cistrome.org/ap/>).

- *PAVIS*: Esta herramienta permite la anotación de los picos y su visualización, además de otros datos genómicos relevantes para facilitar la interpretación biológica de los picos obtenidos, como la localización relativa de los picos con respecto al gen (aguas arriba del sitio de inicio de transcripción (*upstream*), intrón, exón, 5'/3' UTR o aguas abajo del final de la transcripción (*downstream*). Además proporciona una gráfica resumen con la proporción de la localización de los picos analizados (Figura 22A). Se usaron los parámetros por defecto establecidos en dicha herramienta (*upstream*: 5000 pb; *downstream*: 1000 pb). Por otro lado, esta herramienta contiene un sistema de visualización que permite visualizar la localización de los picos de uno o más experimentos simultáneamente, por lo que se puede comprobar y visualizar si existen picos localizados en la misma región génica en distintos experimentos (Figura 22B). Los principales datos proporcionados por el

software PAVIS son:

Gene ID Gene Symbol Chromosome Reference Peak Start Reference Peak end Exp2_start Exp2_end

Las tres primeras columnas muestran los datos de los genes diana, la 4ª y la 5ª muestran los datos de los picos analizados, siendo las sucesivas columnas los datos de los picos de los demás experimentos en el caso de que coincidan en la localización. La localización relativa de los picos se muestra en las filas (*Upstream*; *5' UTR*; *Exon*; *Intron*; *3' UTR*; *Downstream*) [Huang y cols., 2013]. Herramienta disponible en <http://manticore.niehs.nih.gov/pavis2/>.

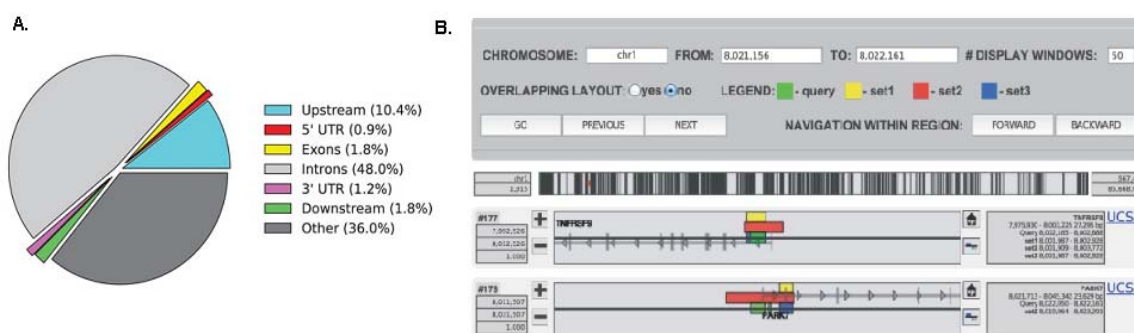


Figura 22. Ejemplos de las herramientas disponibles en el software PAVIS. 22A. Ejemplo de la gráfica sobre la proporción de la localización de los picos proporcionada por PAVIS. **22B.** Ilustración del sistema de visualización de PAVIS. En la parte superior se indican los colores establecidos para los picos de los distintos experimentos. En la parte inferior se visualiza la localización de los picos con respecto al gen que corresponda [adaptada de Huang y cols., 2013].

- PAPST: Esta herramienta permite el análisis de los datos de un número ilimitado de experimentos de manera simultánea de forma muy rápida y versátil, permitiendo conocer las regiones genómicas co-localizadas de distintos experimentos o de distintas proteínas rápidamente. Permite además la creación de una serie de filtros a los que se someten los picos y conocer si éstos están presentes en el promotor (-200pb, +2000pb), en la región downstream (+1000pb), o en el cuerpo del gen (*Body*). Adicionalmente al nombre del gen diana y su localización, proporciona el valor p para cada gen asignado como análisis estadístico, permitiendo además la organización de los genes diana con respecto a este valor. Por otro lado, ofrece la posibilidad de asignar el gen más cercano según su proximidad al inicio de transcripción del gen y finalmente conocer el número de regiones solapantes entre

experimentos (*Compare*), así como la distribución genómica de los picos (*Summarize*) (Figura 23) [Bible y cols., 2015]. Herramienta disponible en (<https://github.com/paulbible/papst>).

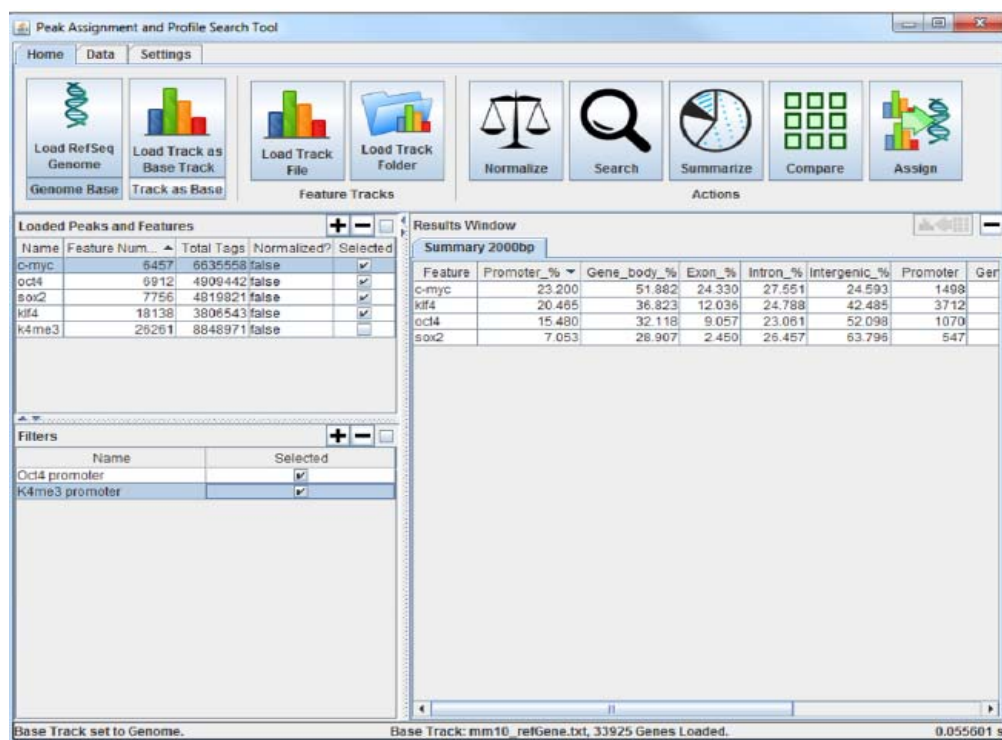


Figura 23. Página principal con los comandos del software PAPST. Se muestra un ejemplo de la opción *Summarize* en la que se muestra la distribución genómica de los picos [adaptada de Bible y cols., 2015].

3.5 Análisis de variantes

Con el objetivo de identificar posibles variantes causantes de HSCR en los genes seleccionados partimos de los datos de secuenciación de exoma completo (WES) obtenidos en nuestro laboratorio de 56 pacientes HSCR, 39 esporádicos (29 S-HSCR y 10 L-HSCR) y 17 casos familiares (9 S-HSCR, 3 L-HSCR y 6 con fenotipo no disponible) [Luzón-Toro y cols., 2015].

Variantes de nucleótido simple (SNVs) y pequeñas inserciones y deleciones (Indels) se anotaron usando la herramienta Annovar (hg19) [Wang y cols., 2010]. Sólo se tuvieron en cuenta aquellas variantes cuya frecuencia alélica menor (MAF) es menor a 0,01 en al menos una de las bases de datos consultadas (*1000 Genomes*, *Exome Variant Server*, *Exome Aggregation Consortium*, *dbSNP*). Adicionalmente los MAF se comprobaron en los exomas secuenciados de 267 individuos

sanos de población española del Proyecto Genoma Médico [Dopazo y cols., 2016]. El posible impacto funcional en las proteínas debido a las SNVs que provocan sustituciones aminoácídicas se predijeron con las herramientas SIFT (<http://sift.bii.a-star.edu.sg>) y Polyphen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>).

También se tuvieron en cuenta las SNVs situadas en las regiones 5' y 3'UTR. Para determinar si las variantes encontradas en las regiones 3'UTR están localizadas en regiones diana de miARN y el efecto de éstas se realizó un análisis *in silico* usando las herramientas *TargetScan* (<http://www.targetscan.org/>) y *RNAhybrid* (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/>). *TargetScan* se utilizó para identificar potenciales sitios diana para miARN en la región donde se localiza la variante. *RNAhybrid* se usó para comprobar el efecto de estas variantes en la unión de los miARN según el método descrito por Vaishnavi y cols.

Todas las variantes finalmente seleccionadas fueron confirmadas por secuenciación Sanger. La nomenclatura empleada para la descripción de las variantes de secuencia identificadas en el presente trabajo se encuadra dentro de las recomendaciones de la “*Human Genome Variation Society*” (<http://www.hgvs.org/mutnomen/>) [den Dunnen y Antonarakis, 2001].

3.6 Análisis estadístico - Expresión de los datos y significación estadística

Los datos obtenidos de los diferentes estudios de expresión realizados tanto por el método Taqman como por SYBR, de los ensayos de proliferación y diferenciación, así como de los resultados obtenidos de los ensayos de western-blot se expresaron como la media \pm error estándar de la media (SEM) de los valores obtenidos en un mínimo de 3 experimentos.

Para saber si las diferencias obtenidas entre dos grupos de datos son significativas estadísticamente se utilizó el método paramétrico de la t de “*Student*” (pareado y de dos colas), considerándose significativas aquellas diferencias cuyo valor p obtenido es menor a 0,05. Los niveles de significancia se presentan como valores p. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001.

3.7 Otras herramientas bioinformáticas utilizadas

3.7.1 Ingenuity pathway analysis (IPA)

IPA (Qiagen, Alemania) es una potente herramienta que permite asociar funciones biológicas y enfermedades a los genes obtenidos experimentalmente. Para ello dicha herramienta se basa en las complejas interacciones biológicas procedentes de trabajos publicados y numerosas bases de datos, todas ellas almacenadas en su propia base de datos denominada *Ingenuity Knowledge Base*. Inicialmente la información ofrecida se presenta con una visión general que permite posteriormente seleccionar y acceder de manera específica y detallada a la información más relevante para el estudio. Además, permite analizar funcionalmente tanto genes aislados como en red, mostrando las funciones biológicas más significativas de los mismos (valor- $p < 0.05$). El análisis funcional de las interacciones en red proporciona una visión general de las funciones biológicas asociadas al gen de interés y a su red de interacción. Estas funciones biológicas están clasificadas en numerosas categorías y subcategorías, lo que permite seleccionar gradualmente a los genes con determinadas funciones, hasta llegar a las más específicas.

Esta herramienta se ha utilizado en el presente estudio con el objetivo de obtener información sobre las funciones de los genes diana de DNMT3b y sus redes de interacción en mamíferos. Específicamente, una vez obtenidas las redes de interacción, se destacaron aquellos genes categorizados dentro de la función “*Cellular development*”. Para ello, la ruta utilizada dentro de la herramienta IPA fue la siguiente: *Genes and Chemicals; Interaction network (human, mouse, rat); Path designer; Overlay tool: Function & Disease; “Cellular development”*.

3.7.2 Bases de datos

Las bases de datos utilizadas para la obtención de las secuencias génicas, proteicas y los transcritos de los genes, así como la información de las mutaciones y polimorfismos descritos, han sido a base de datos *Ensembl* (<http://www.ensembl.org>), el buscador del genoma humano UCSC (<http://genome.ucsc.edu/>) y del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para la obtención de información sobre la función descrita de genes en humanos se utilizó la base de datos *Genecard* (<http://www.genecards.org/>). Para comprobar los genes homólogos entre ratón y humano se utilizó la base de datos *Mouse Genome Informatics* (MGI) (<http://www.informatics.jax.org/>).

3.7.3 Análisis de secuencias

La herramienta BLAST (<http://www.ensembl.org/Multi/Tools/Blast?db=core/>) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) sirve para el alineamiento de secuencias, siendo capaz de comparar la similitud entre una secuencia problema con otras secuencias biológicas. Esta herramienta se utilizó para la búsqueda de regiones con un alto grado de homología tanto en la misma especie como entre especies, siendo además de gran utilidad para diseñar cebadores y analizar la especificidad de secuencia que presentan estos. La herramienta *CLUSTAL OMEGA* (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) se utilizó para comprobar la conservación inter-especie entre secuencias y así confirmar las regiones con alto grado de homología obtenidas con las herramientas anteriores. La herramienta *Sequence Manipulation Suite: CpG Islands* (http://www.bioinformatics.org/sms2/cpg_islands.html) se utilizó para identificar posibles islas CpG en una secuencia dada.

3.7.4 Segregación familiar de variantes

Los árboles familiares de los pacientes HSCR que presentaron variantes en alguno de los genes analizados se realizaron utilizando el software *Cylliric*.

4. RESULTADOS

5.1 Silenciamiento de la *de novo* metiltransferasa *Dnmt3b* en CPEs de ratón

La *de novo* metiltransferasa *DNMT3b* se ha identificado como un gen de susceptibilidad en HSCR así como su posible implicación en la formación del SNE [Torroglosa y cols., 2014], aunque su papel en este proceso es desconocido. Con el objetivo de clarificar cómo su bajada de expresión afecta al desarrollo del SNE y cómo contribuye a la aparición de HSCR, se redujo la expresión de *Dnmt3b* en CPEs de ratón mediante vectores lentivirales que expresaban shARN contra *Dnmt3b*. A continuación, se evaluó el efecto de esta bajada en la proliferación y/o supervivencia celular y diferenciación celular. Posteriormente, se analizó la activación de varias vías de señalización y la expresión de proteínas relacionadas con los procesos celulares evaluados previamente para determinar los mecanismos responsables del efecto causado por la bajada de expresión de *Dnmt3b* en CPEs.

5.1.1 Expresión de *Dnmt3b* en CPEs de ratón y su silenciamiento mediante una selección de partículas lentivirales

Para llevar a cabo el objetivo de evaluar el efecto de la bajada de expresión de *Dnmt3b* sobre las CPEs se comprobó en primer lugar su expresión en los cultivos de NLBs de ratón y se confirmó dicha expresión en las CPEs de ratón, lo que permitió proceder al silenciamiento de *Dnmt3b* en dichos cultivos (Tabla 17).

Tabla 17. Expresión de *Dnmt3b* en los cultivos de NLBs

	<i>Dnmt3b</i> Ct	<i>Beta actina</i> Ct
Cerebro (control)	27	18
NLBs 1	31	19
NLBs 2	22,6	21,3
NLBs 3	23	21,1
NLBs 4	22,4	21
NLBs 5	23	21,1
NLBs 6	25,3	24,5

A continuación se procedió a evaluar el nivel de reducción de la expresión de *Dnmt3b* producido por varios shARN (*Dnmt3b-shARN1*, *Dnmt3b-shARN2*, *Dnmt3b-shARN3*, *Dnmt3b-shARN4*) (LV1, LV2, LV3, LV4) (Tabla 12), obteniéndose de media una bajada de expresión del

70%, 54%, 44%, y 35% respectivamente. En el caso de los cultivos LV-, correspondiente al control del silenciamiento, se obtuvo una media del 5% de subida de la expresión con respecto al control, lo que muestra la ausencia de la bajada de expresión en esta condición. Teniendo en cuenta estos resultados, se seleccionó *Dnmt3b-shARN1* (LV1) para continuar con el estudio ya que fue el que produjo una mayor reducción en el nivel de expresión de *Dnmt3b* (Figura 24).

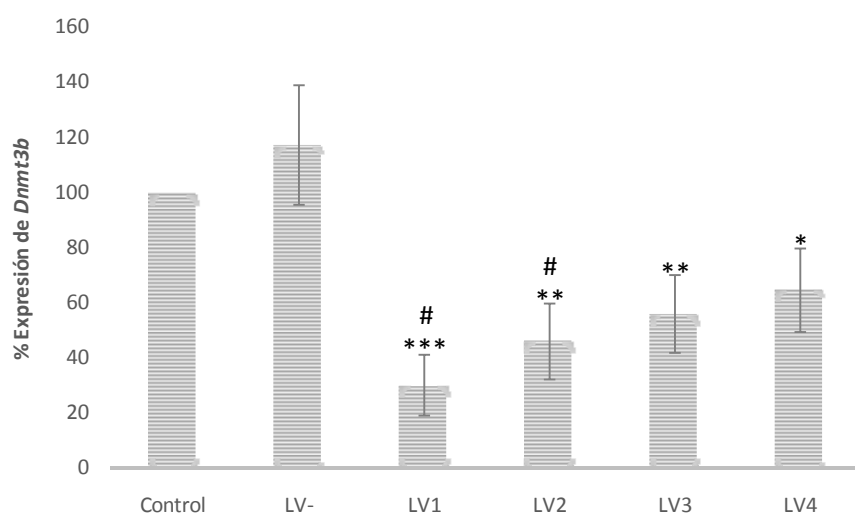


Figura 24. Expresión de *Dnmt3b* en NLBs de ratón tras la infección con varios *Dnmt3b-shARN* (LV1, LV2, LV3 y LV4), así como en la condición control sin infectar y en la condición LV- con un shARN sin diana específica. Valor p LV1/C = 2,1794E-05, LV2/C = 0,002, LV3/C = 0,009 y LV4/C = 0,02. Valor p LV1/LV- = 0,02 y LV2/LV- = 0,01.

5.1.2 La bajada de expresión de *Dnmt3b* en las CPEs no afecta a la diferenciación neuronal

Mediante citometría de flujo se analizó el efecto del silenciamiento de *Dnmt3b* sobre ciertos fenotipos celulares presentes en los cultivos de NLBs, lo que nos permitió evaluar la capacidad neurogénica de las CPEs de ratón. Con este objetivo se analizaron los marcadores p75 para identificar las CPEs derivadas de la cresta neural, Nestina para las células precursoras neurales indiferenciadas y β III-Tubulina para las células precursoras neuronales. Los cultivos LV- y LV1 mostraron un descenso de las células Nestina+ (15%, 3%) y β III-Tubulina+ (6%, 3%) con respecto a los cultivos Control (Figura 25). En cambio, las células p75+ no mostraron diferencias entre las distintas condiciones de cultivos. El sutil descenso detectado en las células Nestina+ y β III-Tubulina+ fue debido al tratamiento con shARN y no debido a la bajada de expresión de *Dnmt3b*, y parece que este efecto es contrarrestado al silenciar *Dnmt3b* ya que se incrementan estos tipos

celulares en la condición LV1 con respecto a la condición LV-. Además, ninguno de estos resultados fue estadísticamente significativo, lo que sugiere que la bajada de expresión de *Dnmt3b* en las CPEs no parece afectar a nivel de su capacidad de generar nuevas neuronas.

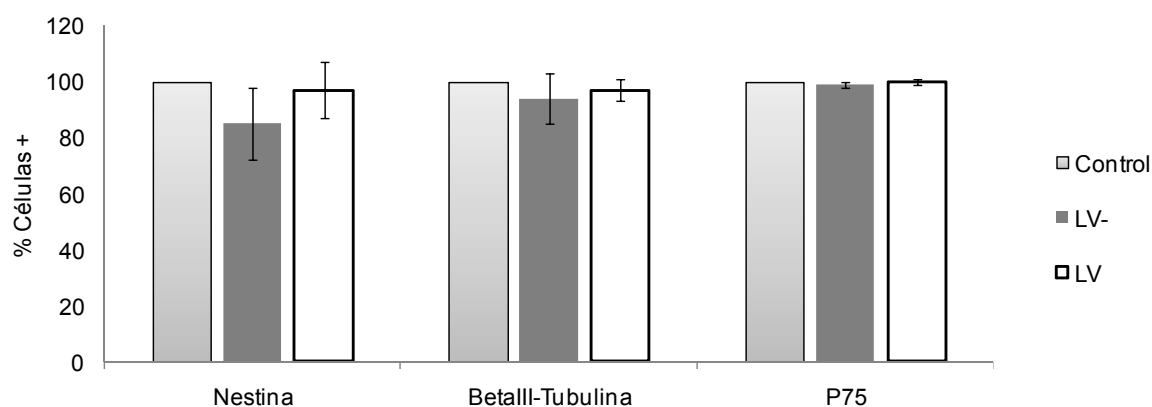


Figura 25. Efecto del silenciamiento de *Dnmt3b* sobre los fenotipos celulares de los precursores entéricos. La gráfica muestra los porcentajes de células que eran positivas para los marcadores Nestina, BetaIII-Tubulina y P75 en las diferentes condiciones de cultivo establecidas.

5.1.3 La bajada de expresión de *Dnmt3b* en las CPEs provoca un aumento de la proliferación y/o supervivencia celular

Para valorar el efecto de la bajada de expresión de *Dnmt3b* sobre la proliferación y/o supervivencia de las CPEs, se midieron dos parámetros en los cultivos de NLBs, el número y el tamaño de las mismas. La medición del número de NLBs nos permite evaluar la capacidad de las células precursoras de proliferar/sobrevivir para formar NLBs, y el tamaño nos indica la capacidad de los precursores en distinto grado de diferenciación que forman parte de la NLBs de proliferar/sobrevivir dentro de la misma. El efecto mostrado en el número de NLBs en los cultivos LV1 fue un aumento significativo del 60% comparado con la condición Control y del 44% comparado con la condición LV- (Figura 26A). Por otro lado, esta bajada de expresión también provocó un aumento del tamaño de las NLBs comparado con las condiciones Control y LV-, siendo este aumento del 18% y del 42% respectivamente. En ambos casos, los efectos observados en la condición LV con respecto a las condiciones Control y LV- fueron estadísticamente significativos (Figura 26B). Tanto en el estudio del número, como en el del tamaño de NLBs, las sutiles diferencias encontradas entre la condición LV- con respecto a la condición Control no

fueron estadísticamente significativas, indicando que el efecto mostrado es debido al silenciamiento de *Dnmt3b* y no al efecto que la partícula lentiviral tiene sobre las células. La figura 27C muestra imágenes representativas de los cultivos de NLBs bajo las tres diferentes condiciones.

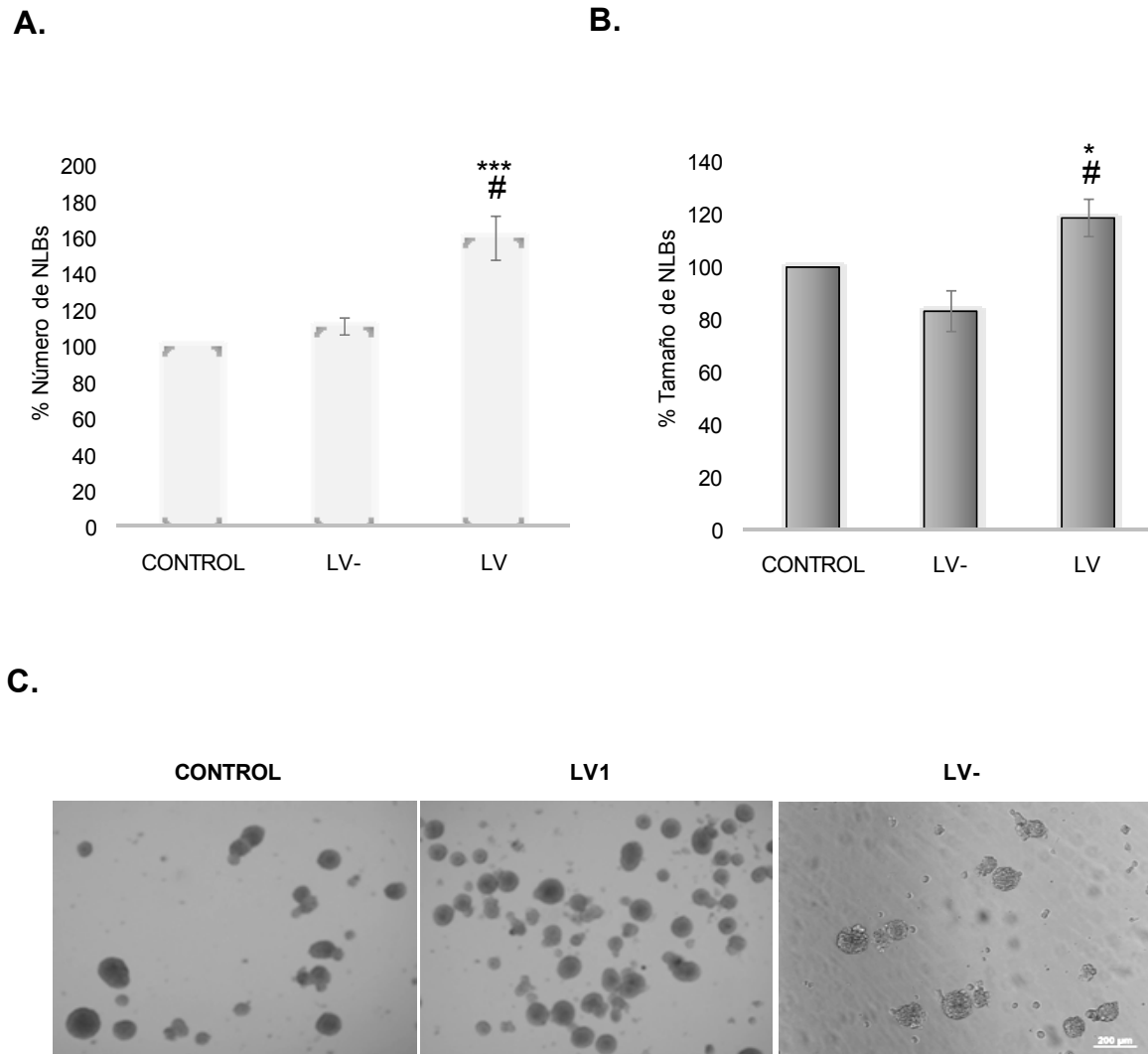


Figura 26. Efecto de la bajada de expresión de *Dnmt3b* en cultivos de NLBs. **A.** Gráfica que muestra el efecto del silenciamiento de *Dnmt3b* en el número de NLBs (valor p LV/C = 0.0004, LV/LV- = 0.02). **B.** Gráfica que muestra el efecto del silenciamiento de *Dnmt3b* en el tamaño de NLBs (valor p LV/C = 0.02, LV/LV- = 0.03). **C.** Imagen representativa que muestra el aspecto de los cultivos de NLBs en cada condición.

5.1.4 Identificación de los posibles mecanismos moleculares implicados en la supervivencia y/o proliferación celular regulados por DNMT3b en las CPEs

Debido al incremento del número y tamaño de NLBs en los cultivos donde se silenció *Dnmt3b* se examinaron los posibles mecanismos a través de los cuales se está llevando la regulación de la supervivencia y/o proliferación mediante esta *de novo* metiltransferasa. Para ello se analizó el estado de activación de varias rutas de señalización y la expresión de proteínas que intervienen en dichos procesos celulares en las distintas condiciones de cultivo mediante Western-blot.

5.1.4.1 La bajada de expresión de *Dnmt3b* no afecta a la activación de las vías de señalización MAPK/ERK, PI3K/Akt y STAT3

Se analizaron las vías MAPK/ERK, PI3K/Akt y STAT3, todas ellas ampliamente relacionadas con la proliferación/supervivencia celular. La vía de señalización MAPK/ERK está principalmente relacionada con la proliferación celular. La activación de las vías PI3K/Akt y STAT3 conduce a una respuesta proliferativa y antiapoptótica. Se analizó el estado de activación de estas vías a las 24 horas de la infección con el lentivirus y a los 7 div. Ninguno de los cambios detectados en la activación de estas vías en los cultivos tras el silenciamiento de *Dnmt3b* fue estadísticamente significativo en comparación con los cultivos control, y por tanto parece que estas vías de señalización no son las responsables del efecto observado sobre la proliferación y/o supervivencia de los cultivos silenciados. Los resultados de este análisis se muestran en la figura 27.

5.1.4.2 La bajada de expresión de *Dnmt3b* afecta a la expresión de p53, pero no a la expresión de Bcl-xL

Se analizó la expresión de las proteínas BCL-XL y P53, ambas asociadas con la supervivencia celular, en las distintas condiciones de cultivo. En el caso de BCL-XL, es una proteína que actúa promoviendo la supervivencia, no se encontraron cambios significativos en los niveles de expresión cuando se compararon las distintas condiciones de cultivo (Figura 28A). Por el contrario, los niveles de expresión de la proteína proapoptótica P53 disminuyeron significativamente en los cultivos silenciados tanto a las 24 horas (65%) como a los 7 div. (27%) al comparar con los cultivos Control, siendo esta diferencia más pronunciada a las 24 horas. También observamos una bajada de P53 (44%, 34%) en los cultivos LV con respecto al LV- a las 24h y 7div. respectivamente, que no resultó significativa. La figura 28B muestra los niveles de P53 obtenidos en las distintas condiciones de cultivo en ambos tiempos.

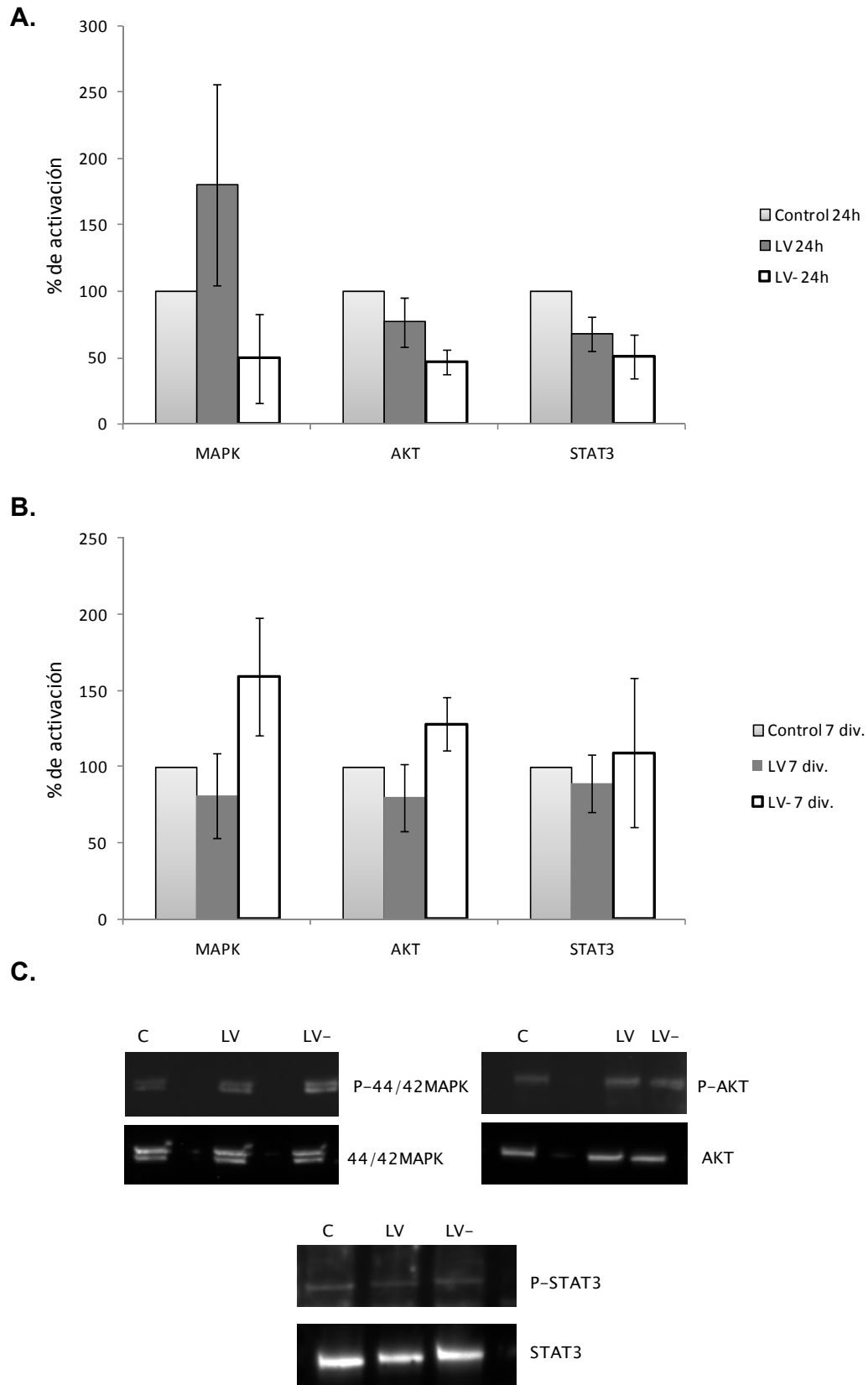


Figura 27. Efecto de la bajada de expresión de *Dnmt3b* sobre la activación de vías de señalización en cultivos de NLBs. 27A. y 27B. Gráficas que muestran el efecto del silenciamiento de *Dnmt3b* en las vías de MAPK/ERK (MAPK), PI3K/Akt (AKT) y STAT3 a las 24h y 7 div. **27C.** Imágenes de los Western-blot más representativos de los resultados obtenidos. Como control de carga se utilizó la Actina.

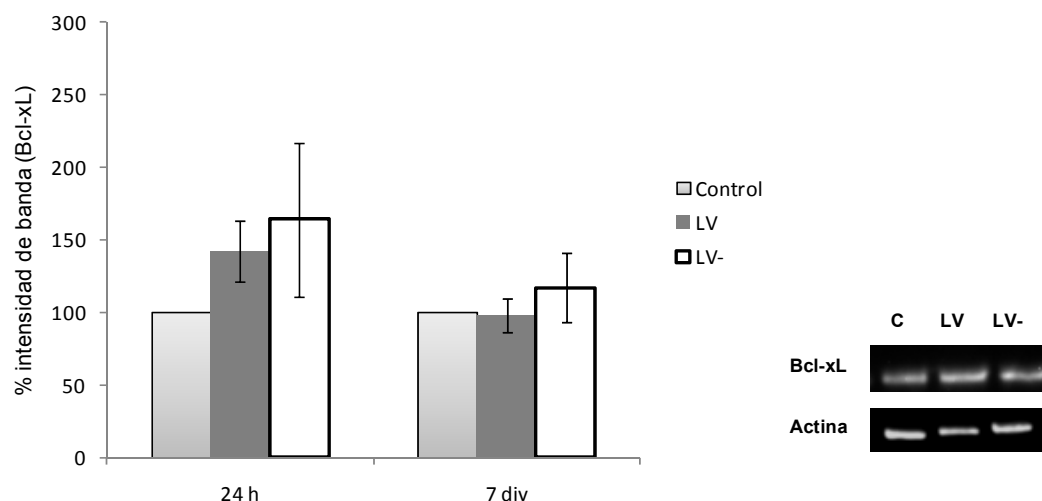
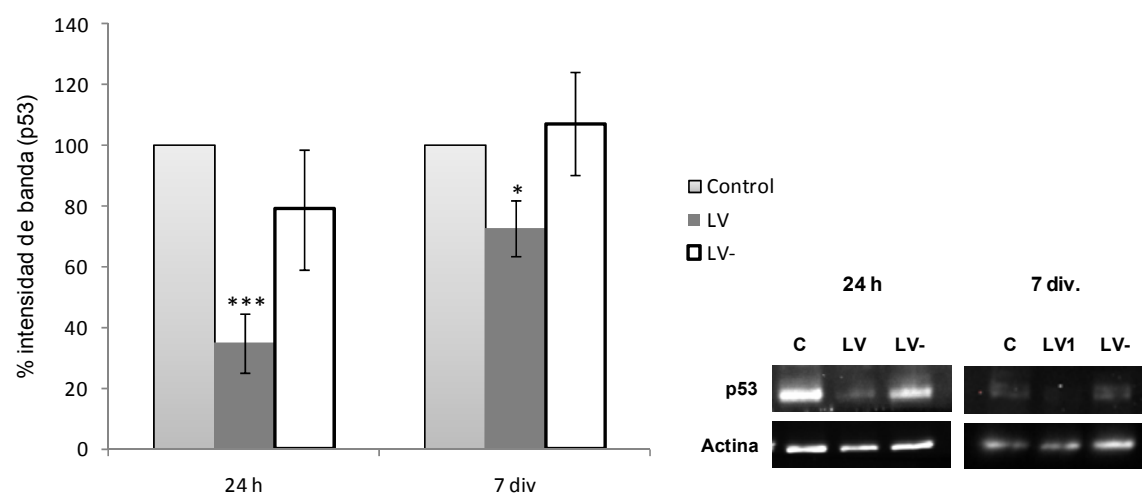
A.**B.**

Figura 28. Efecto de la bajada de expresión de *Dnmt3b* sobre la expresión de *Bcl-xL* y *p53* en cultivos de NLBs. 28A. Izquierda: gráfica que muestra el nivel de expresión de *Bcl-xL* en las tres condiciones a las 24h y 7div. Derecha: imagen representativa de los Western-blot realizados. **28B.** Izquierda: gráfica que muestra el nivel de expresión de *p53* en las tres condiciones a las 24h y 7div. (valor p LV/C 24h = 0.0006, LV/C 7 div.= 0.028). Derecha: imagen representativa de los Western-blot realizados. Como control de carga se utilizó la Actina.

5.1.5 DNMT3b regula el ciclo celular a través de la actividad de *p53/p21*

Los datos obtenidos en los niveles de P53 en los cultivos de NLBs silenciados sugieren una posible regulación de su expresión mediada por DNMT3b. Para determinar si el aumento del crecimiento celular, así como la bajada en los niveles de P53 observado en los cultivos con *Dnmt3b* silenciados es debido a un efecto sobre la proliferación (ciclo celular) o apoptosis, se analizó la expresión de un conjunto de genes relacionados con P53 en vías descritas en proliferación (inhibidor de ciclinas dependientes de kinasa *p21*) y apoptosis (*Caspasa 6*; vía intrínseca: *Puma* y

Bax; vía extrínseca: *Caspasa 8*). Por otro lado, se analizó los niveles de expresión de *Mdm2*, un inhibidor de la expresión de *p53* para comprobar si su bajada en los cultivos LV está mediada por dicho inhibidor y de esta forma obtener una visión más global de la regulación de la expresión de *p53* y su posible efecto. Los niveles de expresión observados de los genes *Mdm2*, *Casp6*, *Casp8*, *Bax* y *Puma* no mostraron cambios en ningún caso, en cambio se detectó un descenso altamente significativo en los niveles de *p21* de aproximadamente un 17% a las 24h, no siendo mantenido a los 7div. Los resultados de este estudio se muestran en la Figura 29.

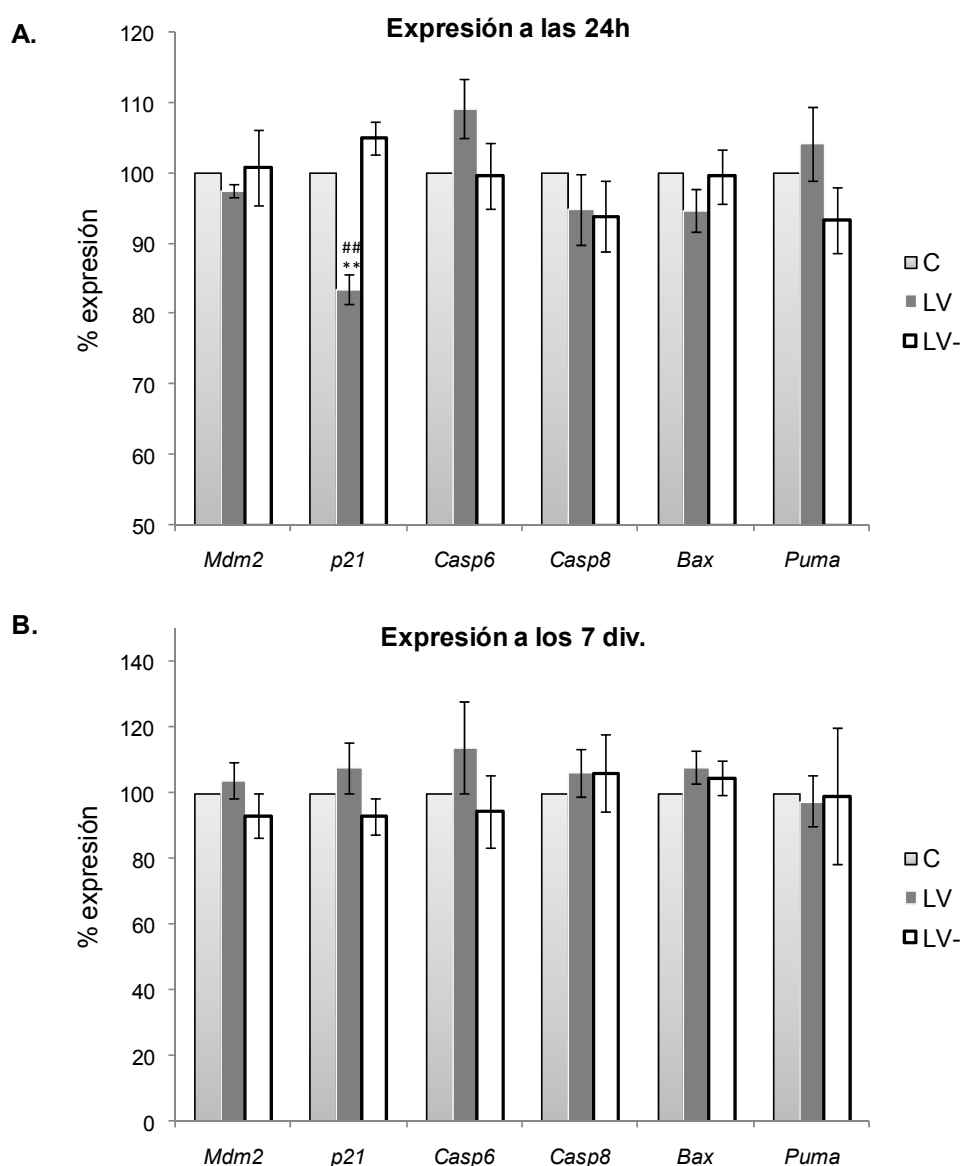


Figura 29. Expresión de *Mdm2*, *p21*, *Casp6*, *Casp8*, *Bax* y *Puma* en las CPEs con *Dnmt3b* silenciado. **29A.** Gráfica que muestra los niveles de expresión de dichos genes a las 24h, en la que se puede observar una disminución significativa de la expresión de *p21* (valor p LV / C = 0,002, LV / LV- = 0,001). **29B.** Gráfica que muestra los niveles de expresión de dichos genes a los 7 div., en la que no se apreciaron cambios.

5.1.6 Expresión de *P53* y *P21* en pacientes HSCR

La bajada de los niveles de *P53* y su diana *p21* en los cultivos de CPEs de ratón tras el silenciamiento de *Dnmt3b*, nos llevó a comprobar los niveles de expresión de ambos genes en dichas células procedentes de los pacientes HSCR con una bajada de expresión de *Dnmt3b* descritos previamente en Torroglosa y cols., 2014. En estos pacientes también se detectó una bajada significativa de la expresión tanto de *P53* (30.3%) como de *P21* (27.7%) con respecto a los controles. Estos resultados consolidan la hipótesis de que la bajada de expresión de *DNMT3b* en las CPEs podría provocar una expresión aberrante de *P53* junto con *P21* y finalmente conducir a la alteración a nivel de ciclo celular que llevaría al aumento del crecimiento de las CPEs que inicialmente se observó en nuestros cultivos. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 30.

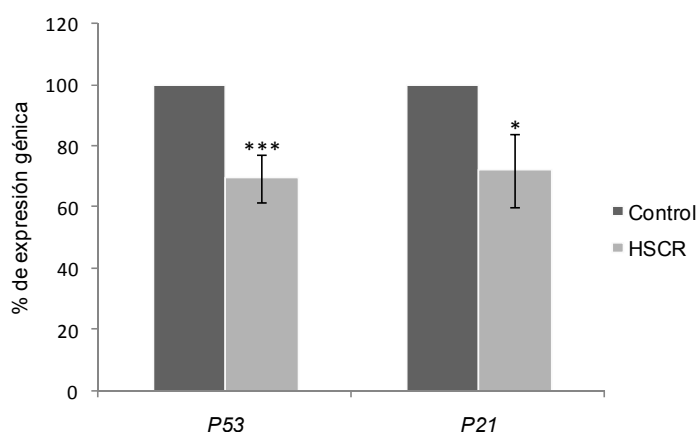


Figura 30. Expresión de *P53* y *P21* en pacientes HSCR con una bajada de expresión de *DNMT3b*. Gráfica que muestra el nivel de expresión diferencial de *P53* (valor $p = 0,0003$) y *P21* (valor $p = 0,02$) en CPEs de pacientes HSCR *versus* controles.

5.2 Identificación de los genes diana de DNMT3b como posibles genes implicados en la formación del SNE y en la enfermedad de HSCR

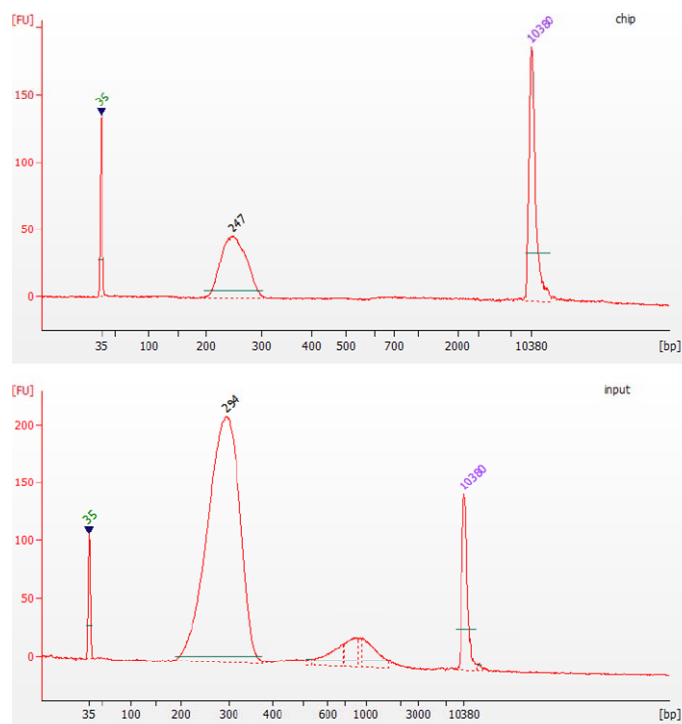
Mediante la técnica ChIP-Seq se identificaron genes diana de DNMT3b en CPEs de ratón, aportando información acerca del patrón de expresión génica regulada por esta proteína. Posteriormente se estudió la posible implicación de dichos genes en HSCR a través del estudio de sus niveles de expresión en CPEs de pacientes HSCR y controles, así como mediante la búsqueda de variantes raras en nuestra cohorte de pacientes. Por tanto, mediante este estudio se pretende identificar nuevos genes implicados en el desarrollo del SNE y en HSCR, lo que nos llevaría a la determinación de un patrón de expresión regulado por DNMT3b posiblemente implicado en el desarrollo de estos procesos.

Cada uno de los pasos llevados a cabo (identificación y selección de las dianas de DNMT3b en ratón, búsqueda de sus genes ortólogos en humanos y estudio de la expresión así como la búsqueda de variantes raras en estos genes) y sus resultados se detalla a continuación:

5.2.1 Validación y cuantificación de las librerías procedentes de los ChIP-Dnmt3b y sus correspondientes Input

La elaboración de las librerías de ChIP-Seq se llevó a cabo como se describe en la metodología. Una vez obtenidas las librerías se comprobó la correcta distribución de los fragmentos de las mismas (200-300 pb) y se cuantificaron para conseguir una concentración de 4nM de cada una de ellas (Figura 31). Finalmente se unificaron y prepararon para su secuenciación como se describe en la metodología.

A.



B.

Librería	Tamaño medio de fragmentos (pb)	[nM]
CHIP1	245	19,8
CHIP2	247	14,1
CHIP3	236	18,2
CHIP4	253	21,9
CHIP5	252	5,6
CHIP6	245	16,9
CHIP7	281	11,4
CHIP8	246	14,6
CHIP9	328	40,5
CHIP10	324	75,3
CHIP11	311	202,6
CHIP12	343	100,9
INPUT1	300	32,7
INPUT2	297	30,9
INPUT3	279	32,2
INPUT4	290	96,8
INPUT5	294	56,9
INPUT6	319	20,5
INPUT7	279	82,2
INPUT8	312	153,9
INPUT9	349	191,9
INPUT10	354	24,3
INPUT11	324	203,3
INPUT12	295	211,4

Figura 31. Características de los fragmentos procedentes de las librerías obtenidas. 31A. Imagen representativa generada en el bioanalizador (arriba= ChIP; abajo= Input) que representa la distribución de los fragmentos presentes en cada librería. Los fragmentos, incluyen los adaptadores, por tanto el tamaño de los insertos a secuenciar son de 100-200 pb. 31B. Tabla que muestra los tamaños medios y concentración en nM de los fragmentos de todas las librerías.

5.2.2 Secuenciación de nueva generación

Se secuenciaron con el sistema Mi-Seq un total de 24 librerías distribuidas en 3 Pools, donde 12 eran librerías ChIP compuestas por las regiones inmunoprecipitadas con el anticuerpo contra DNMT3b y otras 12 eran sus correspondientes librerías Input. El análisis de calidad de las tres secuenciaciones llevadas a cabo se muestra en la tabla 18. Un total de $23,5 \times 10^6$ lecturas pasaron los filtros establecidos por el sistema del Mi-Seq (93,6%) y se obtuvieron $12,1 \times 10^6$ (51%) de lecturas mapeadas con el genoma de referencia mm9 de ratón.

Tabla 18. Datos resultantes del análisis de calidad de la secuenciación de cada Pool, establecido por el sistema MiSeq.

	\geq Q30 %	Cluster que pasan filtros %	Densidad de Cluster K/mm2
POOL1	98,1	94,9	714
POOL2	98,6	95,9	456
POOL3	97,8	92,5	720

Q30 = índice de calidad que predice la probabilidad de error en la lectura, por lo que

\geq Q30 % = % lecturas cuya probabilidad de que una base sea leída incorrectamente es mínimo 1 de 1000 (Fiabilidad mínima del 99,9%).

Cluster = grupos clonales originados por la amplificación de cada fragmento generados previamente a la secuenciación.

5.2.2.1 Análisis de los datos de secuenciación y selección de genes diana de Dnmt3b

Una vez obtenidas las secuencias mapeadas se procedió al análisis computacional de dichas secuencias para obtener las regiones genómicas diana de DNMT3b y de esta forma poder identificar los genes más próximos a dichas regiones. En primer lugar se identificaron mediante el programa Bowtie las regiones genómicas significativamente enriquecidas (picos) en los ChIPs con respecto a sus correspondientes Inputs. En líneas generales pudimos observar tras el análisis de la distribución de las regiones genómicas diana de DNMT3b, que esta proteína se une preferentemente a regiones intergénicas e intrónicas en las CPEs (Figura 32). Finalmente pudimos identificar una serie de genes cuyo sitio de inicio de transcripción se localizaba próximo a dichos picos, lo que estaba establecido por cada uno de las herramientas de análisis descritas en metodología.

Dada la complejidad de la técnica ChIP-Seq y las muchas consideraciones a tener en cuenta para elegir un método de análisis para la selección de los genes diana, no existe un protocolo estándar establecido para todos los estudios realizados con dicha técnica. Además, para la obtención de resultados fiables y de calidad es importante ajustar el diseño y gestión de los datos obtenidos a los objetivos del estudio.

Para asegurar la selección del mayor número posible de genes diana de DNMT3b con fiabilidad, se establecieron dos estrategias metodológicas de análisis.

En el método 1, se unificaron los archivos de lecturas FASTQ de todos los ChIPs secuenciados simultáneamente, es decir, los ChIPs pertenecientes al mismo Pool. Del mismo modo se procedió con las lecturas Input. Con este método, al unificar las lecturas de varios ChIPs se consigue una mayor representación de las regiones diana de nuestra proteína, lo que se traduce a un mayor número de picos estadísticamente significativos en los ChIPs con respecto a los Inputs. Se obtuvieron dos archivos de lecturas por cada Pool, uno con las lecturas de todos los ChIPs y otro con todas las de los Inputs. Tras mapear las lecturas con el genoma de referencia, se identificaron los picos obteniéndose un total de 895. Mediante las tres herramientas *in silico* (BETA minus, PAVIS y PAPST) se identificaron los genes más cercanos a los picos y se seleccionaron aquellos que aparecían en al menos dos de las herramientas utilizadas y en al menos dos de los tres Pools analizados (Figura 33).

Distribución de las dianas de Dnmt3b (%)

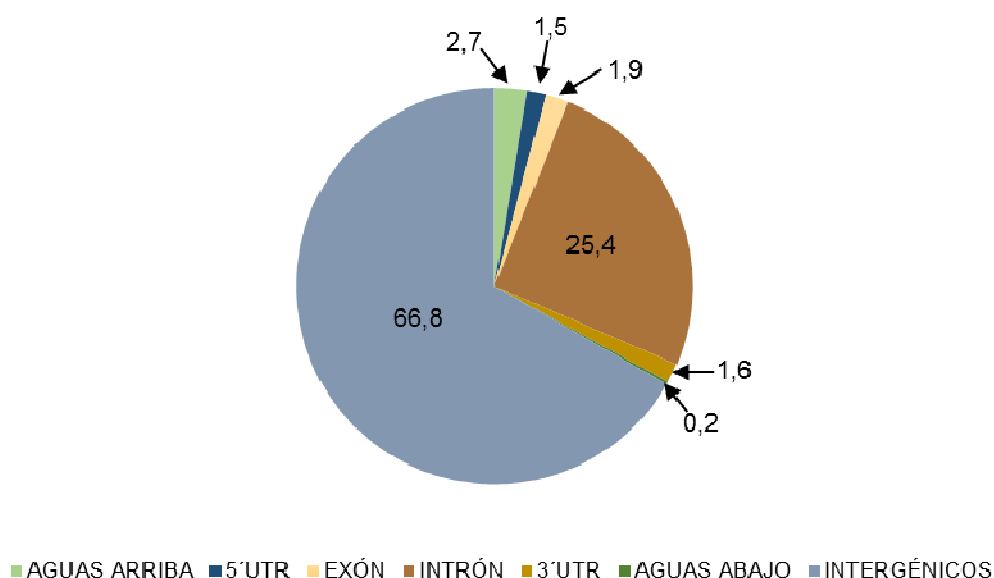


Figura 32. Distribución de los picos obtenidos en el ensayo ChIP-Seq de Dnmt3b. El diagrama muestra la distribución de los picos que corresponden a los sitios de unión de DNMT3b que son preferiblemente regiones intergénicas e intrónicas.

En el método 2 los archivos FASTQ de cada ChIP pertenecientes a cada uno de los Pool se analizaron individualmente y los picos obtenidos se procesaron con la herramienta Cluster, que nos permitió obtener los intervalos que comprenden los picos solapantes a los que denominamos Clusters. Este método reduce considerablemente el número de picos obtenidos aumentando la confianza. Finalmente, se obtuvo un archivo para cada clusters procedente de cada Pool, que resultó en 150 picos en total y mediante el uso de las herramientas BETA minus y PAVIS se identificaron los genes cercanos a los mismos. Este método establece un filtrado previo que selecciona los picos solapantes a los cuales se les asignó los genes más próximos, aunque nosotros establecimos un filtrado adicional considerando aquellos genes que aparecían en al menos 2 de los 3 clusters.

Mediante ambos métodos se obtuvieron en total 1839 genes diferentes (1808 con el método 1 y 112 con el método 2), a continuación se llevó a cabo el filtrado establecido para cada uno de los métodos, que nos llevó a obtener un menor número de genes, 15 genes como potenciales dianas de DNMT3b, siendo 6 de ellos los que aparecen en ambos métodos (*Rn45s*, *Dpp9*, *Mydgf*, *Myo7a*, *Ano2*, *Gm17644*). Debido a que los filtros de cada uno de los métodos son diferentes, determinados genes

sólo aparecieron en uno de los métodos: método 1 (*Kpna1*, *4933422A05Rik*, *Chl1*, *Cyr61*, *Gphn* y *Bbx*) y método 2 (*Sulf1*, *2210408I21Rik* y *Ly75*), por lo que el uso de ambos métodos de forma complementaria es necesario para obtener un mayor número de genes diana de DNMT3b fiables (Figura 34; Tabla 19).

De los genes resultantes que no pasaron algunos de los filtros establecidos se seleccionaron adicionalmente 12 de ellos debido a que nos parecieron interesantes añadirlos al estudio. De estos genes, 10, se añadieron debido a su relación descrita con el desarrollo celular, neural y/o de las CCN, y 2, los genes *4921504E06Rik* y *Tmem125*, debido al interés de no tener aún función conocida. Por tanto finalmente se seleccionaron un total de 27 genes como potenciales dianas de DNMT3b en CPEs y como posibles genes implicados en la aparición de HSCR (Tabla 19). Todos los detalles de las regiones de unión de DNMT3b a los genes diana finalmente seleccionados, como la localización exacta de dichas regiones, se muestran en la Tabla 20.

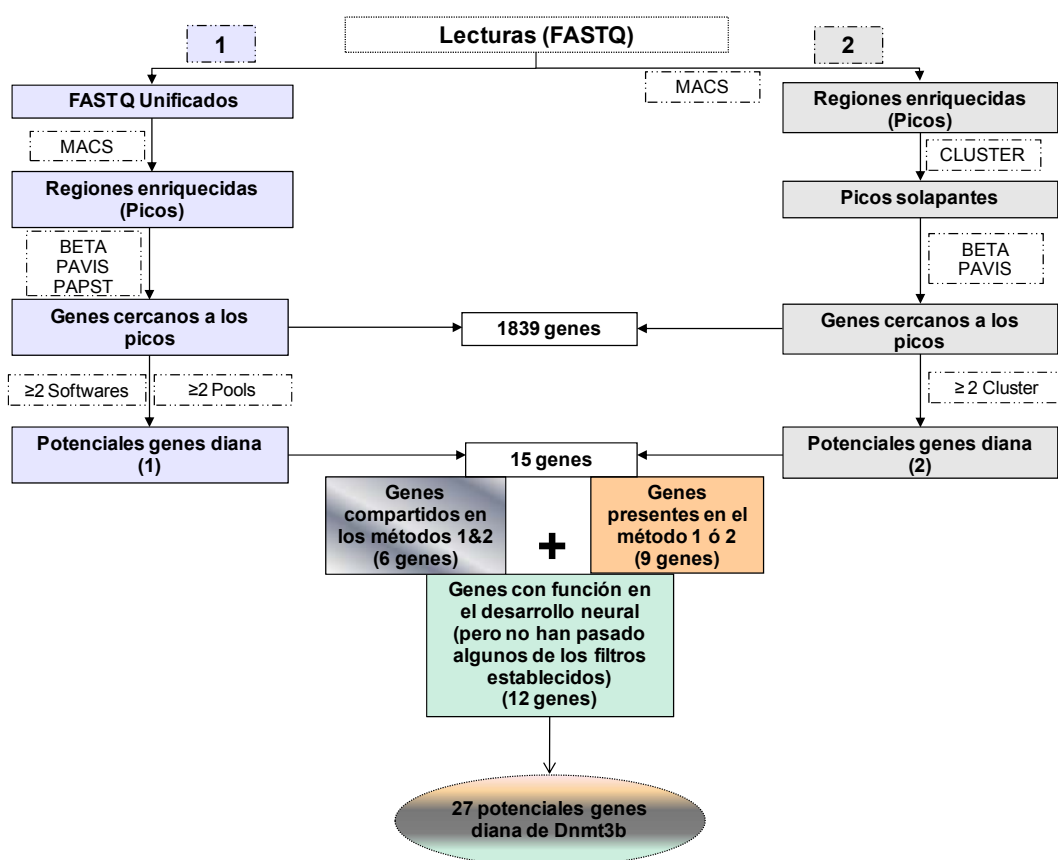


Figura 33. Priorización y selección de los genes diana de Dnmt3b. El diagrama muestra los enfoques metodológicos utilizados para la selección de los genes diana de DNMT3b.

Tabla 19. Genes seleccionados como dianas de Dnmt3b en CPEs de ratón.

Métodos de análisis	Genes	Genes diana de DNMT3B
Genes compartidos en el método 1 & 2 (6 genes)	<i>Rn45s</i> <i>Dpp9</i> <i>Mydgf</i> <i>Myo7a</i> <i>Ano2</i> <i>Gm17644</i>	
Genes presentes en el método 1 ó 2 (9 genes)	<i>Sulf1</i> <i>2210408I21Rik</i> <i>Ly75</i> <i>Kpna1</i> <i>4933422A05Rik</i> <i>Chl1</i> <i>Cyr61</i> <i>Gphn</i> <i>Bbx</i>	
Genes con función en el desarrollo (no pasan alguno de los filtros establecidos) (10 genes)	<i>Rab10os</i> <i>Drg1</i> <i>Eif4enif1</i> <i>Sfi1</i> <i>Ppp2r2b</i> <i>Dopey2</i> <i>Smo</i> <i>Litaf</i> <i>Cdk5rap2</i> <i>Limd1</i>	
Genes con función aún desconocida (2 genes)	<i>4921504E06Rik</i> <i>Tmem125</i>	

Tabla 20. Picos asociados a los genes diana seleccionados.

Gen	Localización del gen	Método	Cromosoma	Inicio del pico	Fin del pico	Localización del pico	Valor p (-10 ³ log10)	Distancia a tss	Tasa de cambio
<i>Rn45s</i>	Chr17:39979941-39985774	POOL1	Chr17	39983425	39985166	Promotor	85,31	4354	9,65
		POOL2	Chr17	39983326	39984752		180,09	4098	2,94
		CLUSTER1	Chr17	39983425	39985166		130,29	4586	2538,5
		CLUSTER3#	Chr17	39979811	39983080		53,635	1653	3,07
<i>Dpp9*</i>	Chr17:56326104-56358312	POOL1	Chr17	56339276	56339653	Intrón	271,33	18848	48,49
		POOL2	Chr17	56339282	56339632		1084,42	18855	16,62
		POOL3	Chr17	56339281	56339651		132,2	18846	20,35
		CLUSTER1	Chr17	56339276	56339653		311,96	18848	10228,47
<i>Mydgf*</i>	Chr17:56315963-56323343	CLUSTER2	Chr17	56339282	56339632	Aguas arriba	1539,49	18855	5793,19
		POOL1	Chr17	56339276	56339653		271,33	16121	48,49
		POOL2	Chr17	56339282	56339632		1084,42	16114	16,62
		POOL3	Chr17	56339281	56339651		132,2	16123	20,35
<i>Myo7a</i>	Chr7:105199563-105268003	CLUSTER1	Chr17	56339276	56339653	Intrón	311,96	16121	10228,47
		CLUSTER2	Chr17	56339282	56339632		1539,49	16114	5793,19
		POOL1	Chr7	105208395	105208753		327,69	59429	2032,78
		POOL2	Chr7	105208382	105208755		701,82	59435	22,38
<i>Ano2</i>	Chr6:125640436-125990146	POOL3	Chr7	105208379	105208746	Intrón	122,96	59441	30,77
		CLUSTER1	Chr7	105208400	105208753		177,50	59427	5565,77
		CLUSTER2	Chr7	105208382	105208755		960,63	59435	3382,095
		POOL1	Chr6	125826778	125827196	Intrón	356,42	186551	2236,06
<i>Gm17644*</i>	Chr1:12657643-12663171	POOL2	Chr6	125826779	125827344		1013,47	186625	250
		POOL3	Chr6	125826781	125827379		157,09	186644	40
		CLUSTER1	Chr6	125826779	125827344		197,19	186551	3878,55
		CLUSTER2	Chr6	125826779	125827344		467,4	186625	2829,62
<i>Sulf1*</i>	Chr1:12657643-12663171	POOL1	Chr1	12634697	12635078	Aguas arriba	618,61	22756	4065,56
		POOL2	Chr1	12634707	12635076		1025,12	22752	17,57
		POOL3	Chr1	12634701	12635204		137,29	22691	27,72
		CLUSTER1	Chr1	12634696	12635078		290,99	22756	9086,41
<i>2210408121Rik</i>	Chr13:77274796-77752940	CLUSTER2	Chr1	12634706	12635076	Aguas arriba	1297,69	22752	4396,93
		POOL1	Chr1	12634697	12635078		618,61	47623	4065,56
		POOL2	Chr1	12634707	12635076		1025,12	47619	17,57
		POOL3	Chr1	12634701	12635204		137,29	47558	27,72
<i>Ly75</i>	Chr2:60131816-60221288	CLUSTER1	Chr1	12634696	12635078	Aguas arriba	290,99	47623	9086,41
		CLUSTER2	Chr1	12634706	12635076		1297,69	47619	4396,93
		POOL2	Chr13	77578016	77578466	Intrón	1302,39	303445	1,98
		CLUSTER2	Chr13	77578016	77578466		984,04	303445	2,05
<i>Kpna1</i>	Chr16:35983448-36036248	CLUSTER3	Chr13	77578015	77578467		661,92	303445	2,14
		POOL1	Chr2	60240665	60241040	Aguas abajo	231,43	19564	27,2
		POOL2	Chr2	60240665	60241040		1226,44	19564	20,62
		POOL3	Chr2	60240346	60241043		201,22	19406	52,27
<i>4933422A05Rik</i>	Chr9:35088689-35093008	CLUSTER2	Chr2	60240665	60241043		863,65	19564	21,935
		POOL1	Chr16	35981645	35982043	Promotor	187,595	19566	67,325
		POOL2	Chr16	35981668	35982039		85,39	1604	19,65
		CLUSTER1	Chr16	35981645	35982043		287,47	1595	111,82
<i>Chl1</i>	Chr6:103460869-103683029	POOL2	Chr9	35112650	35113328	Aguas arriba	150,805	1604	2737,28
		POOL3	Chr9	35112647	35113329		3100	24299	1,7
		POOL2	Chr6	103598902	103599435		114,58	24298	1,97
		POOL3	Chr6	103598892	103599435		1415,34	138299	1,54
<i>Cyr61</i>	Chr3:145309934-145312949	CLUSTER3	Chr6	103598890	103599437	Intrón	67,97	138294	1,81
		POOL2	Chr3	145353839	145354047		439,78	138294	1,91
		POOL3	Chr3	145353761	145354189		482,8	40994	6,24
		CLUSTER2	Chr3	145353839	145354047		64,44	41026	20
<i>Gphn</i>	Chr12:79327641-79785756	POOL1	Chr12	79451809	79452131	Intrón	522,6	40994	73,08
		POOL2	Chr12	79451908	79452249		94,12	124329	609,83
		POOL3	Chr16	50414561	50414915	Intrón	131,84	124437	10
		POOL2	Chr16	50414561	50414766		121,18	17764	813,11
<i>Rab10os</i>	Chr12:3235790-3250374	POOL2	Chr12	3109720	3110257	Aguas arriba	502,39	17839	20
		POOL3	Chr12	3109708	3110271		3100	125802	1,79
		POOL2	Chr11	3079230	3079531		68,98	125801	1,81
		POOL2	Chr11	3003799	3004158		195,92	87009	11,54
<i>Elf4enif1*</i>	Chr11:3102355-3144591	CLUSTER3	Chr11	3003569	3004177	Aguas arriba	69,82	98607	2,7
		POOL1	Chr11	3003569	3004177		186,83	98712	6
		POOL2	Chr11	3004536	3004762		113,02	97936	2,75
		POOL3	Chr11	3079230	3079531		195,92	14086	11,54
<i>Ppp2r2b</i>	Chr18:42804874-43059160	CLUSTER3	Chr18	43135262	43135919	Intrón	64,26	83535	6,85
		POOL3#	Chr18	42903358	42903921		72,89	315486	23,09
		CLUSTER3	Chr16	93789435	93789735	Intrón	90,5	77434	3,79
		CLUSTER3	Chr6	29697604	29699093		90,34	12852	3,74
<i>Dopey2</i>	Chr16:93712151-93810833	POOL2	Chr16	10975026	10975387	Intrón	264,46	18008	2,26
		CLUSTER3	Chr16	10975020	10975406		191,77	18001	2,34
		POOL2	Chr4	70039006	70039391	Intrón	345,61	32203	1,46
		CLUSTER3	Chr4	70039006	70039438		452,48	32179	2,15
<i>Smo</i>	Chr6:29685496-29711366	POOL1	Chr9	123370956	123371348	Aguas arriba	206,66	16666	1422,95
		CLUSTER1	Chr9	123370956	123371348		206,66	16666	1422,95
		CLUSTER 4	Chr2	19430949	19431174	Intrón	60,83	44476	3,71
		CLUSTER 4	Chr4	118219511	118221491		97,26	4170	5,51
<i>Limd1</i>	Chr9:123387818-123430670	CLUSTER 4	Chr4	118219511	118221491	Promotor			
<i>4921504E06Rik</i>	Chr2: 19384463-19475537	CLUSTER 4	Chr4	118219511	118221491	Promotor			
<i>Tmem125</i>	Chr4:118213545-118216331	CLUSTER 4	Chr4	118219511	118221491	Promotor			

Se nombra al método 1 como POOL y al método 2 como CLUSTER, indicando posteriormente en cual de las tres secuenciaciones aparece (1, 2 ó 3)

*genes con picos compartidos con otros genes

#picos que han dado el mismo gen pero corresponden a regiones genómica diferentes.

5.2.2.2 Genes diana de DNMT3b en humanos

Con el objetivo de evaluar la posible implicación en la aparición de HSCR de los 27 genes seleccionados como diana de DNMT3b, se procedió a identificar los genes correspondientes en humanos. Utilizando la base de datos MGI se identificaron los genes ortólogos de dichas dianas en el genoma humano. La mayoría de estos genes comparten el mismo nombre entre ratón y humanos y en algunos casos tienen un nombre diferente. En el caso del gen *Rn45s* no se encontró su ortólogo en MGI, pero en la base de datos *GeneCards* se pudo identificar dicho gen en humano, principalmente conocido como *RNA45S5*. En otros casos el gen ortólogo en humano es aún desconocido, por lo que se buscó la posible región homóloga por similitud de secuencia mediante la herramienta BLAST. En este sentido del gen *Rn45s* se comprobó también su secuencia homóloga, identificándose más de una región genómica con un alto grado de homología para dicho gen en humanos, dichas regiones correspondieron a dos lncARN (*CH507-528H12.1* y *CH507-513H4.4*), con un porcentaje de similitud (99,79%) en ambos casos. Por tanto, los genes *RNA45S5*, *CH507-528H12.1* y *CH507-513H4.4* fueron seleccionados para su posterior estudio. La tabla 21 muestra los genes que presentaron alguna de las excepciones detalladas anteriormente.

Tabla 21. Genes homólogos en humano.

Ratón	Tipo de gen	Humano	Tipo de gen
<i>Rn45s</i>	rRNA	<i>RNA45S5</i>	rRNA
		<i>CH507-528H12.1*</i> (99,79%) [0.0e+00]	lncRNA
		<i>CH507-513H4.4*</i> (99,79%) [0.0e+00]	lncRNA
<i>Gm17644</i>	lncRNA	<i>LINC01603*</i> (79,27%) [5.7e-23]	lncRNA
<i>2210408I21Rik</i>	codificante	<i>KIAA0825</i>	codificante
<i>4933422A05Rik</i>	lncRNA	<i>RP11-220D10.1*</i> (82,44%) [1.3e-131]	pseudogen
<i>Rab10os</i>	lncRNA	<i>RAB10*</i> (96,28%) [1.7e-115]	codificante
<i>4921504E06Rik</i>	codificante	<i>C10ORF67</i>	codificante

*Ortólogos humanos desconocidos y seleccionados por similitud de secuencia mediante la herramienta BLAST

%Similitud entre la secuencia génica de ratón y humano

[E-val]Probabilidad de que el alineamiento entre ambas secuencias sea debido a una casualidad

5.2.2.3 Identificación de genes relacionados con las dianas de DNMT3b como posibles genes de susceptibilidad en HSCR

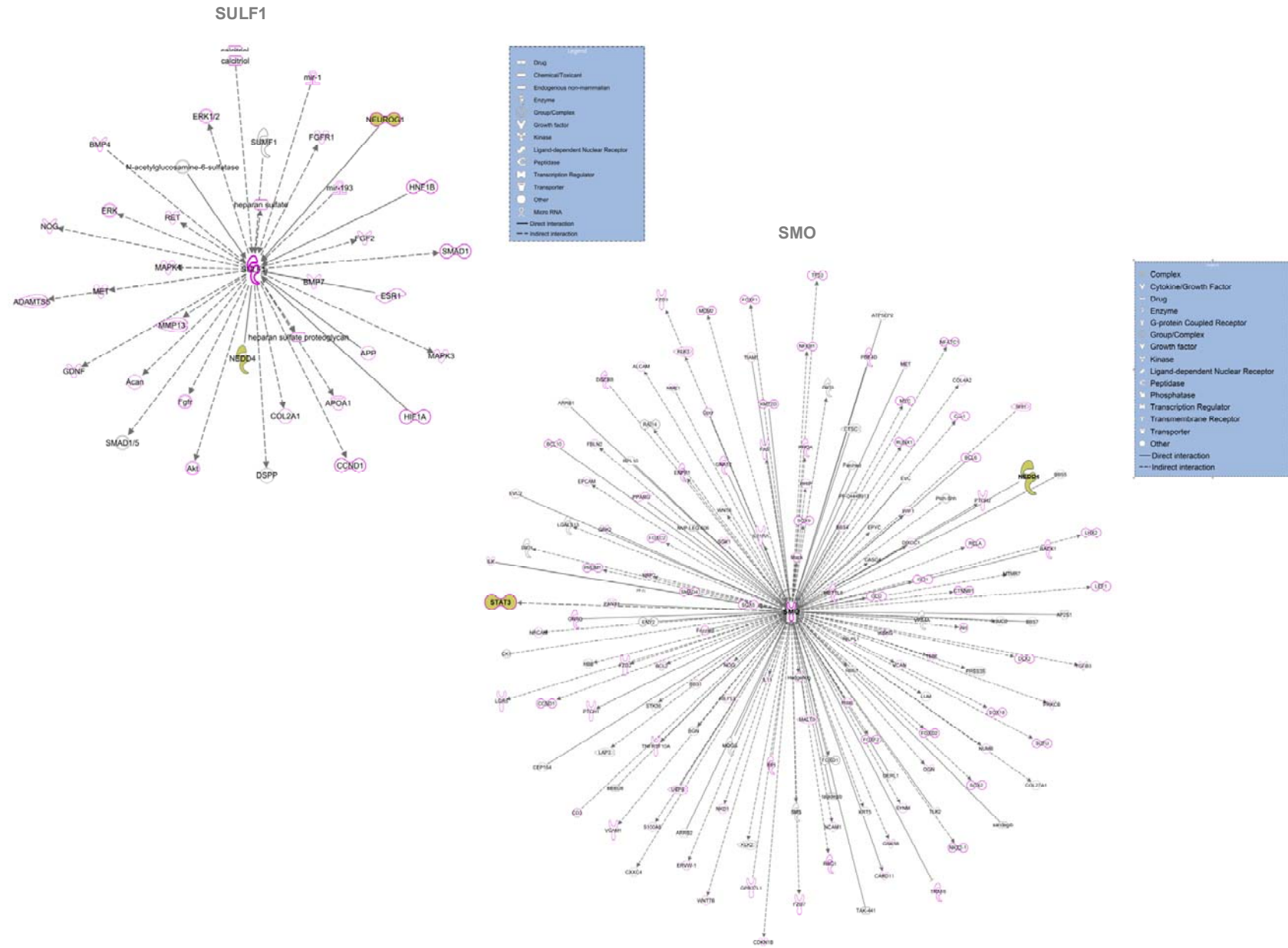
A partir de los 27 genes seleccionados, mediante la herramienta IPA se analizaron sus interacciones génicas en mamíferos, destacando aquellos genes englobados en la categoría funcional “*cellular development*” (Figura 34). Esta herramienta permite visualizar globalmente mediante diagramas, las complejas redes y vías biológicas en las que participan estos genes, basándose en datos publicados. Tras examinar los diagramas con los genes resultantes, se

incorporaron los genes *EED*, *STAT3*, *NEUROG1*, *ADAM8*, *NEDD4* y *NEDD4L* al estudio (Tabla 22), siendo los criterios de selección para cada gen los siguientes:

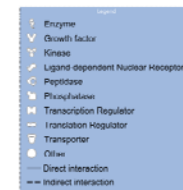
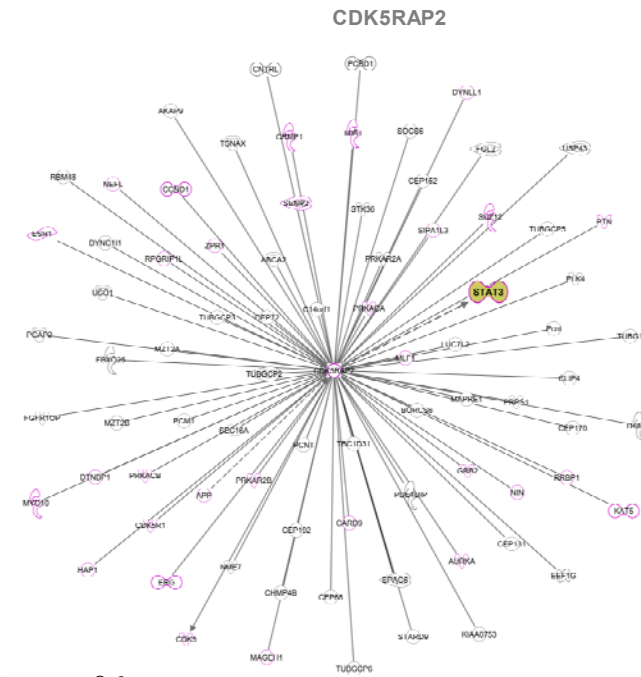
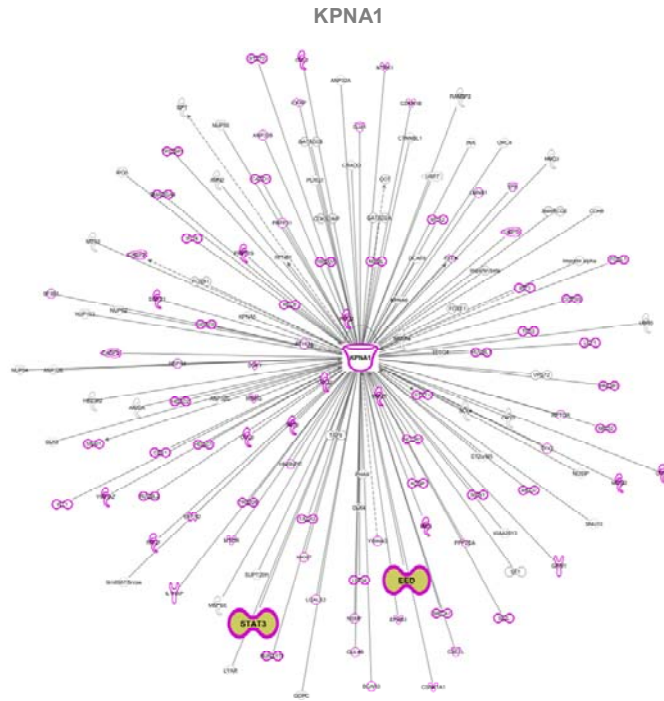
- *EED* y *STAT3*: Pertenecen a la categoría funcional de “*cellular development*”, estando además relacionados con varios de los genes diana de DNMT3b.
- *NEUROG1* y *ADAM8*: Pertenecen a la categoría funcional de “*cellular development*” y ambos genes están implicados en la neurogénesis. *NEUROG1* está implicado en la diferenciación neuronal durante el desarrollo embrionario y *ADAM8* en la adhesión y apoptosis neuronal.
- *NEDD4* y *NEDD4L*: Genes pertenecientes a la misma familia (*Neural Precursor Cell Expressed, Developmentally Down-Regulated*). *NEDD4* se identificó como gen que interaccionaba con más de uno de los genes diana de DNMT3b seleccionados. En el caso de *NEDD4L* sólo interacciona con *BBX*, pero al pertenecer a la misma familia de *NEDD4* se decidió estudiar ambos genes conjuntamente.

Finalmente se contó con 34 genes más 1 pseudogén (*RP11 220D10.1*) para estudiar su posible implicación en el desarrollo del SNE y por tanto su papel en la aparición de HSCR (Tabla 23). Es importante aclarar que hemos obtenido un elevado número de genes mediante esta aproximación, por lo que se podría haber aumentado el número de genes en el estudio, pero es evidente que brinda la posibilidad de continuar con la búsqueda de genes implicados en la enfermedad a partir de este conjunto de genes.

Resultados

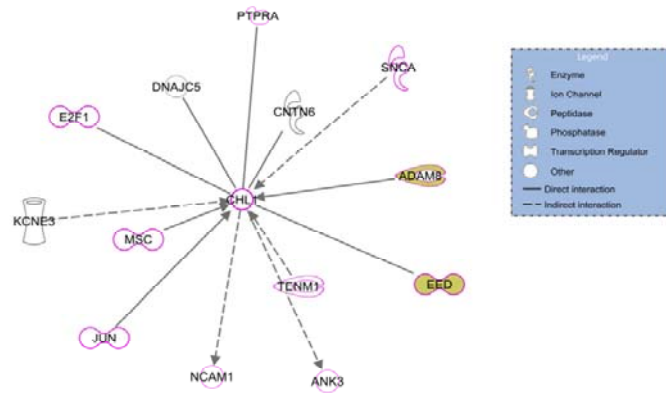


Resultados

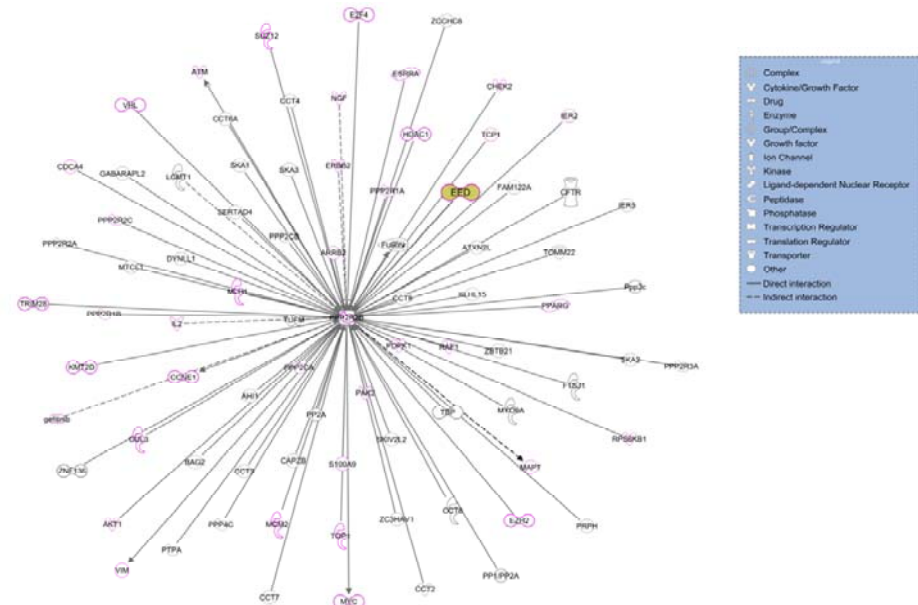


Resultados

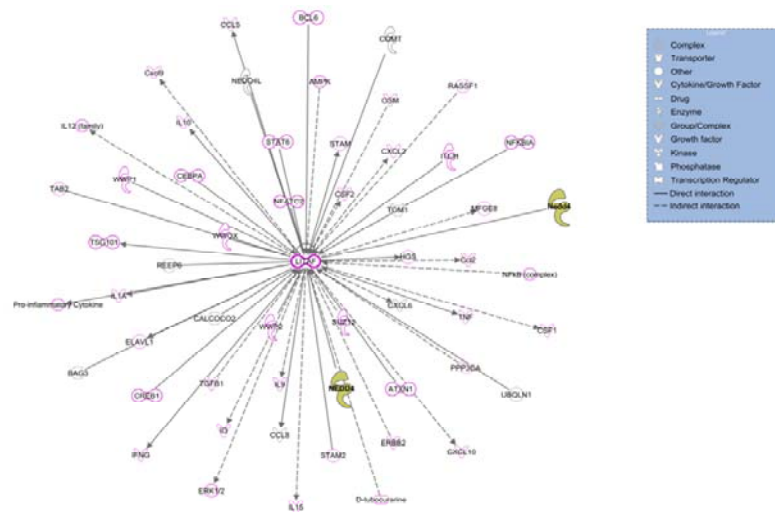
CHL1



PPP2R2B



LITAF



BBX

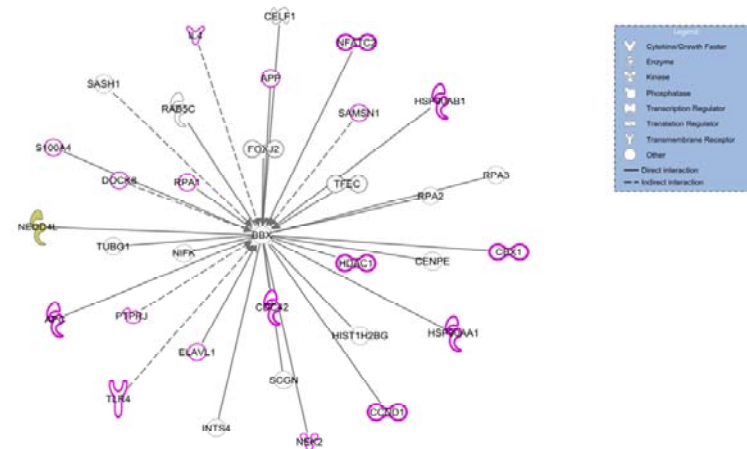


Figura 34. Diagramas de las redes de interacción génica de las dianas de DNMT3b. Las líneas rectas representan correlación e interacciones del tipo ARN-ARN y proteína-proteína. Las flechas representan las interacciones de activación, expresión, modificación, escisión molecular, fosforilación, regulación de unión, transcripción, localización, e interacciones proteína-ADN y proteína-ARN, así como la dirección del efecto causado. Los genes pertenecientes a la categoría funcional “celular development” se marcan en rosa y aquellos genes seleccionados por nosotros para comprobar su patrón de expresión en pacientes HSCR se marcan en amarillo.

Tabla 22. Genes diana de DNMT3b que interaccionan con los genes seleccionados para la evaluación de su implicación en HSCR.

Genes diana de DNMT3b	Genes relacionados seleccionados
<i>CHL1</i>	<i>EED; ADAM8</i>
<i>KPNA1</i>	<i>STAT3; EED</i>
<i>BBX</i>	<i>NEDD4L</i>
<i>SULF1</i>	<i>NEDD4; NEUROG1</i>
<i>PPP2R2B</i>	<i>EED</i>
<i>SMO</i>	<i>NEDD4; STAT3</i>
<i>CDK5RAP2</i>	<i>STAT3</i>
<i>LITAF</i>	<i>NEDD4</i>

Tabla 23. Genes incluidos en el estudio de expresión diferencial en NLBs humanas.

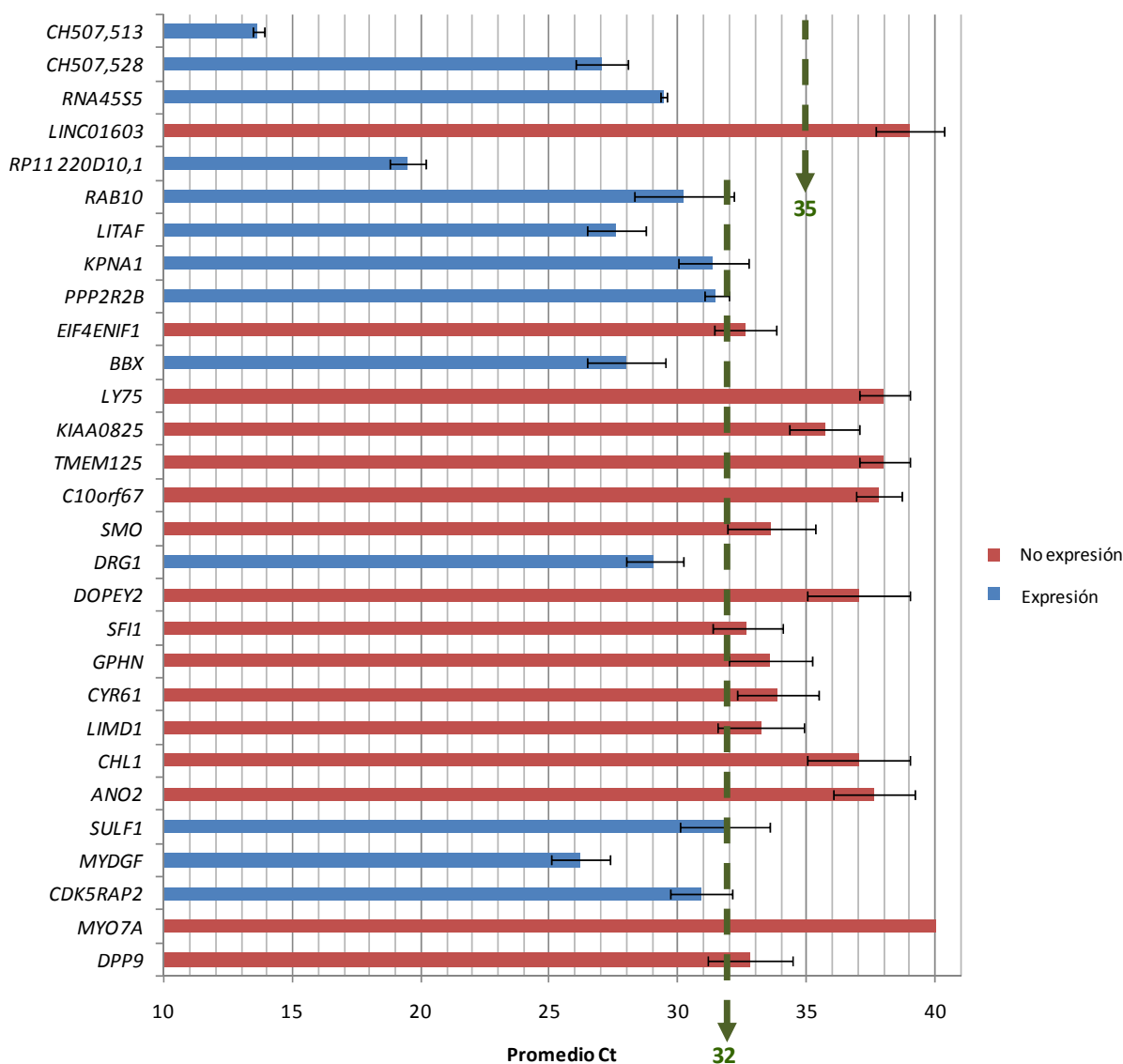
Método	Gen	Nombre	Selección
TaqMan® Array Plate	<i>DPP9</i>	Dipeptidyl Peptidase 9	Genes diana de DNMT3B
	<i>MYO7A</i>	Myosin VIIA	
	<i>CDK5RAP2</i>	CDK5 Regulatory Subunit Associated Protein 2	
	<i>MYDGF</i>	Myeloid-Derived Growth Factor	
	<i>SULF1</i>	Sulfatase 1	
	<i>ANO2</i>	Anoctamin 2	
	<i>CHL1</i>	Cell Adhesion Molecule L1 Like	
	<i>LIMD1</i>	LIM Domains Containing 1	
	<i>CYR61</i>	Cysteine Rich Angiogenic Inducer 61	
	<i>GPHN</i>	Gephyrin	
	<i>SFI1</i>	SFI1 Centrin Binding Protein	
	<i>DOPEY2</i>	Dopey Family Member 2	
	<i>DRG1</i>	Developmentally Regulated GTP Binding Protein 1	
	<i>SMO</i>	Smoothened Frizzled Class Receptor	
	<i>C10ORF67</i>	Chromosome 10 Open Reading Frame 67	
	<i>TMEM125</i>	Transmembrane Protein 125	
	<i>KIAA0825</i>	KIAA0825	
	<i>LY75</i>	Lymphocyte Antigen 75	
	<i>BBX</i>	Bobby Sox Homolog	
	<i>EIF4ENIF1</i>	Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Nuclear Import Factor 1	
	<i>PPP2R2B</i>	Protein Phosphatase 2 Regulatory Subunit B. Beta	
	<i>KPNA1</i>	Kayopherin Subunit Alpha 1	
	<i>LITAF</i>	Lipopolysaccharide Induced TNF Factor	
	<i>RAB10</i>	RAB10. Member RAS Oncogene Family	
	<i>EED</i>	Embryonic Ectoderm Development	Genes relacionados con las dianas de DNMT3B
	<i>NEDD4</i>	Neural Precursor Cell Expressed, Developmentally Down-Regulated 4. E3 Ubiquitin Protein Ligase	
	<i>NEDD4L</i>	Neural Precursor Cell Expressed, Developmentally Down-Regulated 4-Like. E3 Ubiquitin Protein Ligase	
	<i>STAT3</i>	Signal Transducer and Activator of Transcription 3	
	<i>NEUROG1</i>	Neurogenin 1	
	<i>ADAM8</i>	ADAM Metallopeptidase Domain 8	
	<i>S18</i>	Control endógeno	
SYBR Green	<i>RP11-220D10.1</i>	Ribosomal Protein L36 Pseudogene 14	Genes diana de DNMT3B
	<i>LINC01603</i>	Long Intergenic NON-Protein Coding RNA 1603	
	<i>RNA45S5</i>	RNA, 45S Pre-Ribosomal 5	
	<i>CH507-528H12.1</i>	CH507-528H12.1	
	<i>CH507-513H4.4</i>	CH507-513H4.4	
	<i>GAPDH</i>	Control endógeno	

5.2.2.4 Patrón de expresión de las dianas de DNMT3b y de los genes relacionados con estas en CPEs humanas

Con el objetivo de esclarecer el patrón de expresión génica regulado por DNMT3b, se analizó el patrón de expresión de sus dianas mediante TLDA o *SYBR Green* en CPEs humanas (Tabla 23) y se observó que de los 29 genes analizados, 13 mostraron expresión positiva (Figura 35A). Adicionalmente, se comprobó el patrón de expresión de los 5 genes seleccionados por su relación con algunas de estas dianas (Tabla 23) y se detectó una expresión positiva en los genes *STAT3* y *EED* (Figura 35B). Por tanto, un total de 15 genes (13 dianas de DNMT3b y 2 genes relacionados con estas) se expresan en las CPEs humanas (Tabla 24), lo que sugiere que podrían jugar un papel en estas células y por tanto su implicación en el desarrollo del SNE.

A.

Expresión génica de las dianas de DNMT3b en CPEs humanas



B. Expresión génica de genes relacionados con las dianas de DNMT3b en CPEs humanas

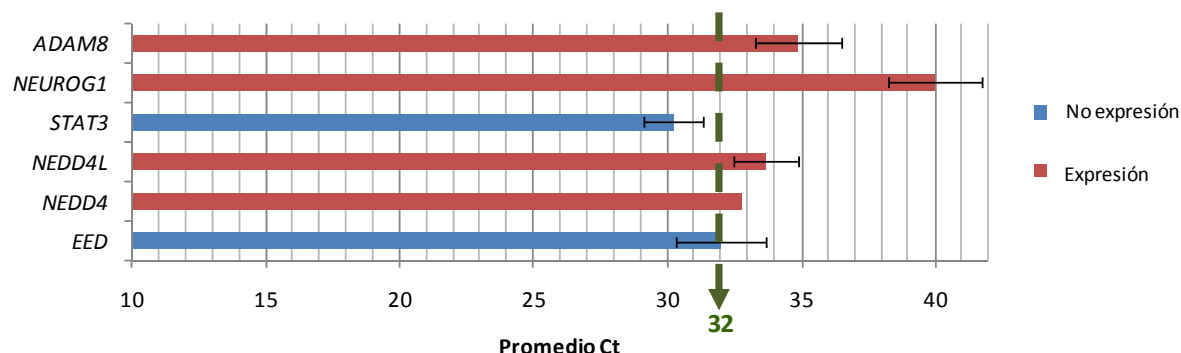


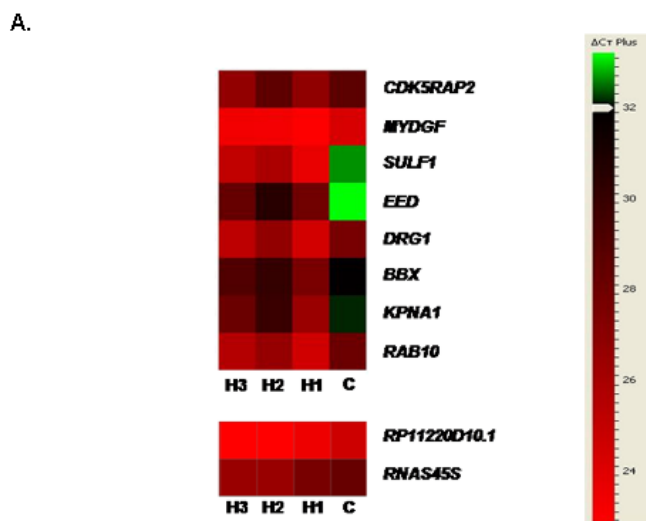
Figura 35. Patrón de expresión de las dianas de DNMT3b (A) y los genes relacionados con estas (B) en las CPEs de controles humanos. Un Ct>32 o Ct>35 está establecido según la metodología empleada como no expresión.

5.2.2.5 Análisis diferencial de los patrones de expresión génica en CPEs humanas de pacientes HSCR y controles

Con el propósito de evaluar la posible implicación en HSCR de los 34 genes y el pseudogén (*RP11-220D10*), se realizó el estudio de expresión diferencial entre CPEs de pacientes HSCR *versus* controles. En los genes (14 genes y el pseudogén) que se observó su expresión positiva (Tabla 24) detectamos que 9 de ellos (*KPNA1*, *EED*, *SULF1*, *CDK5RAP2*, *BBX*, *DRG1*, *RAB10*, *MYDGF* y *RNA45S5*) junto con el pseudogén *RP11 220D10.1* mostraron diferencias (tasa de cambio ≥ 2) estadísticamente significativas (valor $p \leq 0,05$) con respecto a los controles. Dichos genes mostraban niveles de expresión anormalmente elevados en el grupo HSCR (Figura 36). En los genes que no se observó expresión en las CPEs controles tampoco se observó en nuestros pacientes HSCR.

Tabla 24. Genes expresados en CPEs de humanos.

Gen	Ct	Función
<i>CDK5RAP2</i>	30	Proteína centrosomal esencial para el correcto ciclo celular mitótico
<i>MYDGF</i>	26	Factor de crecimiento derivado mieloide sin papel descrito en el desarrollo del Sistema nervioso. Promueve la supervivencia de miocitos cardíacos y la proliferación de células endoteliales
<i>SULF1</i>	32	Endosulfata 6-O-N-acetylglucosamina. Remodela el patrón de sulfatación en la superficie celular, cambiando la afinidad de los ligandos y receptores. Papel en el desarrollo de la cresta neural y SNE a través de la modulación de vías de señalización
<i>EED</i>	32	Componente principal del complejo Polycomb represivo 2 (PRC2), un regulador epigenético que metila la Lys-9 y Lys-27 de la histona H3
<i>STAT3</i>	30	Media la expresión de una variedad de genes en respuesta a estímulos celulares, por tanto, juega un papel clave en varios procesos celulares como crecimiento celular y apoptosis
<i>DRG1</i>	29	Miembro de la familia DRG, una nueva subfamilia perteneciente a la superfamilia de las GTPasas. Tiene un papel importante en la proliferación y/o diferenciación celular durante el desarrollo del Sistema Nervioso
<i>BBX</i>	28	Factor de transcripción miembro de la familia SOX. Ha sido asociado con el mantenimiento de las células madre neurales, desarrollo de las células de la cresta neural y renovación de células progenitoras
<i>PPP2R2B</i>	31	Subunidad regulatoria Bβ de la proteína fosfatasa 2, y está asociada con una enfermedad neurodegenerativa, la ataxia espinocerebelar tipo 12 (SCA12). Participa en la supervivencia neuronal del cerebro en desarrollo
<i>KPNA1</i>	31	karyopherina alpha1, una proteína que pertenece a la familia de la importina-alpha, receptores requeridos para el transporte nuclear de proteínas reguladoras como STAT3 y EED
<i>LITAF</i>	27	Factor TNF-alfa inducido por lipopolisacáridos cuyas principales funciones son la respuesta inflamatoria y apoptosis
<i>RAB10</i>	30	Miembro de la familia de oncogenes RAB GTPasas implicado en el tráfico de vesículas. Estos eventos mediados por RAB10 son esenciales para la correcta morfogénesis neuronal y formación de las redes neuronales en el SNC
<i>RP11-220D10.1</i>	19	Pseudogén. Función aún desconocida
<i>RNA45S5</i>	29	ARN no codificante que sirve como precursor para los ARNr 18S, 5.8S y 28S.
<i>CH507-528H12.1</i>	27	LincRNA. Función aún desconocida
<i>CH507-513H4.4</i>	14	LincRNA. Función aún desconocida



B.

Gen	Expresión	P value	Tasa de cambio
<i>CDK5RAP2</i>	↑	0,01	2
<i>MYDGF</i>	↑	0,01	2
<i>SULF1</i>	↑	0,0005	6
<i>EED</i>	↑	0,0003	3
<i>DRG1</i>	↑	0,002	3
<i>BBX</i>	↑	0,03	2
<i>KPNA1</i>	↑	0,001	2
<i>RAB10</i>	↑	0,01	2
<i>RP11 220D10.1</i>	↑	0,003	2
<i>RNA45S5</i>	↑	0,01	7

Figura 36. Genes con niveles de expresión diferencial entre las CPEs de pacientes frente a controles. **36A.** El HeatMap se generó utilizando el software DataAssist™ (Life Technologies). Representa el perfil de expresión diferencial entre 9 genes y el pseudogén al comparar las CPEs de pacientes HSCR y controles (p value < 0,05). Los genes fueron agrupados jerárquicamente usando un promedio de vinculación con el coeficiente de correlación de Pearson. La escala de colores representa el ΔC_t . El color verde indica genes con relativa disminución de la expresión, mientras que el rojo indica los genes con una mayor expresión relativa. H (paciente HSCR); C (Control). **36B.** Tabla que muestra la dirección del cambio observado en la expresión de dichos genes en las CPEs de pacientes HSCR comparado con controles, así como el p -value y la tasa de cambio.

5.2.2.6 Identificación de variantes raras en pacientes HSCR en los genes expresados en CPEs humanas

Con el fin de evaluar la implicación mediante otro mecanismo en la aparición de HSCR de los 14 genes y el pseudogén expresados en CPEs humanos, se llevó a cabo la búsqueda de variantes raras ($MAF < 0,01$) en los mismos. Para ello analizamos los datos de secuenciación del exoma completo de los 56 pacientes HSCR citados en metodología.

De todas las variantes raras que se observaron, se filtraron las variantes no sinónimas, deleciones e inserciones en las regiones exónicas, así como las variantes localizadas en las regiones UTR, resultando un total de 12 variantes raras heterocigóticas (10 SNVs y 2 deleciones) identificadas en 5 de los 15 genes estudiados en 10 pacientes (2 mujeres; 8 varones; ningún caso sindrómico; sin mutaciones en genes previamente asociados a HSCR). Todas ellas fueron confirmadas por secuenciación Sanger. Nueve de estas variantes se localizaron en exones y 3 en regiones UTR y a continuación se estudió su potencial patogenicidad *in silico* mediante las herramientas bioinformáticas Polyphen y SIFT. También se analizó la tasa de aparición de estas variantes en varias bases de datos, entre ellas destacar la procedente de la secuenciación de exoma completo de los 267 individuos sanos de población española del Proyecto Genoma Médico [Dopazo y cols., 2016]. En líneas generales observamos una muy baja aparición o la ausencia de dichas variantes en la población control (Tabla 25).

Los análisis revelaron que sólo un caso de S-HSCR familiar portaba una variante rara en el gen *BBX* (*c.241C>T;p.Arg81Trp*), pero dicha variante no segregaba con la enfermedad, ya que no estaba presente en los miembros afectados de la familia y es heredada de la madre no afecta. El resto de variantes se identificaron en casos de HSCR esporádicos (7 S-HSCR y 2 L-HSCR) y todas fueron heredadas de uno de los padres y ocasionalmente también aparecían en hermanos no afectados. De todos los casos analizados, es interesante comentar la identificación de una combinación de variantes en dos de los genes candidatos (*SULF1* y *CDK5RAP2*) en dos pacientes HSCR esporádicos (Tabla 25).

Resultados

Tabla 25. Variantes raras identificadas en la secuenciación del exoma de pacientes HSCR

Genes	RefSeq	Localización	Variantes	rs	Id ^a pacientes	Herencia	Fenotipo	1000G_MAF (phase 3) ALL	1000G_MAF (phase 3) EUR	EVS_MAF	ExAC_MAF	MGP_MAF	Predicción In silico (SIFT /Polyphen2)
BBX	NM_020235	3:g.107466840 C>T; exon	c.779C>T;p.Ala260Val	rs150121801	3733 ^b	Paterna	S-HSCR	0.0012	0.002	0.0012	0.0026	ND	T/B
		3:g.107435532 C>T; exon	c.241C>T;p.Arg81Trp	rs142400819	4086	Materna	S-HSCR (Familiar)	0.0030	0.007	0.0030	0.0028	0,006	D/D
SULF1	NM_015170	8:g.70541785_70541787delAAC; exon	c.2155_2157delAAC;p.Asn720del	rs150178205	10943	Materna	L-HSCR	0.0038	N	0.0045	0.0009	0,002	Neutral/-
RAB10	NM_016131	2:g.26257138 C>T; 5'UTR	c.-340C>T	rs112783454	4949	Paterna	S-HSCR	0.0052	0.012 ^d	N	N	0,008	
		2:g.26257109_26257110delGA;5'UTR	c.-369_-368delGA	rs745876590	4462 ^b	Paterna	S-HSCR	N ^c	N	N	N	ND	
PPP2R2B	NM_181674	5:g.145979904 C>T; exon	c.1108G>A;p.Val370Ile	rs369931023	3485	Paterna	S-HSCR	0.0002	N	0.00008	0.00006	ND	T/B
		5:g.146017897 T>C; exon	c.905A>G;p.Asn302Ser	rs150981315	3708	Paterna	S-HSCR	N	N	0.0003	0.0004	ND	D/B
		5:g.145969279 G>C; 3'UTR	c.*231C>G	rs141447016	3364	Materna	L-HSCR	0.0038	0.007	N	N	ND	
CDK5RAP2	NM_018249	9:g.123334309 G>T; exon	c.70C>A;p.Pro24Thr		3606	Paterna	S-HSCR	N	N	N	N	ND	T/B
		9:g.123216045 T>C; exon	c.2482A>G;p.Lys828Glu	rs549081765	8079	Materna	S-HSCR	0.0004	N	N	0.0002	ND	T/B
		9:g.123253661 T>C; exon	c.1406A>G;p.Asn469Ser	rs754779136	8079	Paterna	S-HSCR	N	N	N	0.000008	ND	T/B
		9:g.123287277 G>A; exon	c.1079C>T;p.Thr360Ile	rs145165171	10943	Paterna	L-HSCR	0.001	0.004	0.001	0.0009	0,002	T/B

^a Pacientes con dos variantes diferentes en negrita

^b Variantes también presentes en un hermano/a

^c N significa variantes no presente en la base de datos (1000 Genomes, EVS, ExAC)

^d MAF>0.01 en población Europea

ND:No disponible

10943=II:1

8079=II:4

Uno de ellos es el caso del paciente 8079, individuo masculino con fenotipo S-HSCR que porta dos variantes raras diferentes en el gen *CDK5RAP2*, cada una heredada un progenitor (*c.2482A>G;p.Lys828Glu* y *c.1406A>G;p.Asn469Ser*) (Figura 37A). El otro caso es el del paciente 10943, individuo femenino con fenotipo L-HSCR el cual porta dos variantes en dos genes diferentes, una delección en *SULF1* (*c.2155_2157delAAC;p.Asn720del*) y una SNV en *CDK5RAP2* (*c.1079C>T;p.Thr360Ile*), cada una heredada de un progenitor (Figura 37B). Ambos resultados apoyan el modelo aditivo propuesto para la enfermedad, ya que los individuos enfermos portan una combinación de variantes no presente en individuos sanos. Por último, cabe destacar que en el gen *CDK5RAP2* se han encontrado en total de cuatro variantes raras en tres pacientes no relacionados.

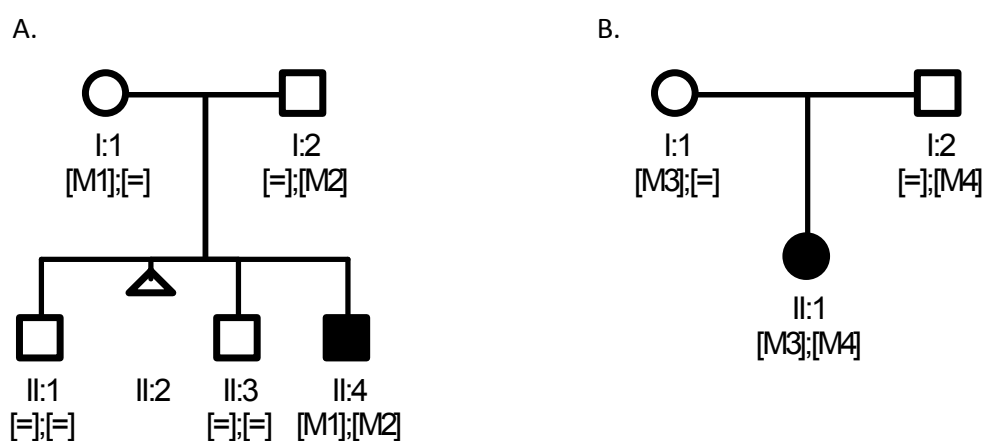


Figura 37. Árboles familiares de los pacientes 8079 (II:4) y 10943 (II:1). Árboles familiares en los que se muestran el genotipo de cada individuo y la combinación de las dos variantes raras portadas por el individuo afectado que concuerdan con el modelo aditivo de HSCR. M1= *c.2482A>G;p.Lys828Glu* en *CDK5RAP2*; M2= *c.1406A>G;p.Asn469Ser* en *CDK5RAP2*; M3= *c.2155_2157delAAC;p.Asn720del* en *SULF1* y M4= *c.1079C>T;p.Thr360Ile* en *CDK5RAP2*.

En cuanto a las variantes localizadas en las regiones UTR, cabe mencionar la variante *c.*231C>G* en el 3'UTR del gen *PPP2R2B*, que se identificó en el paciente 3364 con fenotipo L-HSCR. A continuación, se analizó si dicha variante se localizaba en sitios de unión de miARN y su posible impacto en la unión de los mismos. Para ello, primero se identificaron los posibles miARNs cuya diana es la región donde está localizada la variante, mediante el uso de la herramienta *TargetScan*, manteniendo sólo aquellos miARNs que se confirmaron con la herramienta *RNAhybrid*. Finalmente se identificaron 3 miARNs (miR-4676-3p, miR-452-5p y miR-892c-3p) y se comprobó si la variante alteraba la eficiencia de unión de estos miARNs que viene determinada por el valor de

$\Delta\Delta G$. Este parámetro resulta del cálculo de la energía mínima libre (MFE) de los dúplex formados con la secuencia *wildtype* menos la MFE de la secuencia con la variante ($\Delta\Delta G = \text{MFE ancestral} - \text{MFE variante}$) y cuanto mayor es dicho valor de $\Delta\Delta G$, mayor es el impacto de la variante.

Un dato a tener en cuenta para el análisis de los resultados, es la secuencia *seed* que se encuentra en las posiciones 2-7 del 5' de los miARN y que debe ser perfectamente complementaria con la secuencia diana del ARNm para llevar a cabo la regulación de la expresión génica. Teniendo en cuenta esto, la variante c.*231C>G, provocó la pérdida de la complementariedad de la región “*seed*” en los tres casos, perdiendo probablemente la unión de los miARN al ARNm de *PPP2R2B* (Figura 38).

A.

Gen	Identificación	Cambio	miRNA	Context ++ score	MFE wt (kcal/mol)	MFE variante (kcal/mol)	ΔΔG (kcal/mol)	Unión miRNA
PPP2R2B	rs141447016	c.*231C>G	miR-4676-3p	-0,13	-19,5	-15,6	-3,9	X
			miR-452-5p	-0,11	-18	0	-18	X
			miR-892c-3p	-0,11	-18,4	-15,9	-2,5	X

El valor de MFE con la variante se establece como 0 para el miR-452-5p debido a que RNAhybrid no muestra dicha región como diana de este miRNA cuando la secuencia presenta la variante.

X indica la pérdida completa de la unión del miRNA.

B.

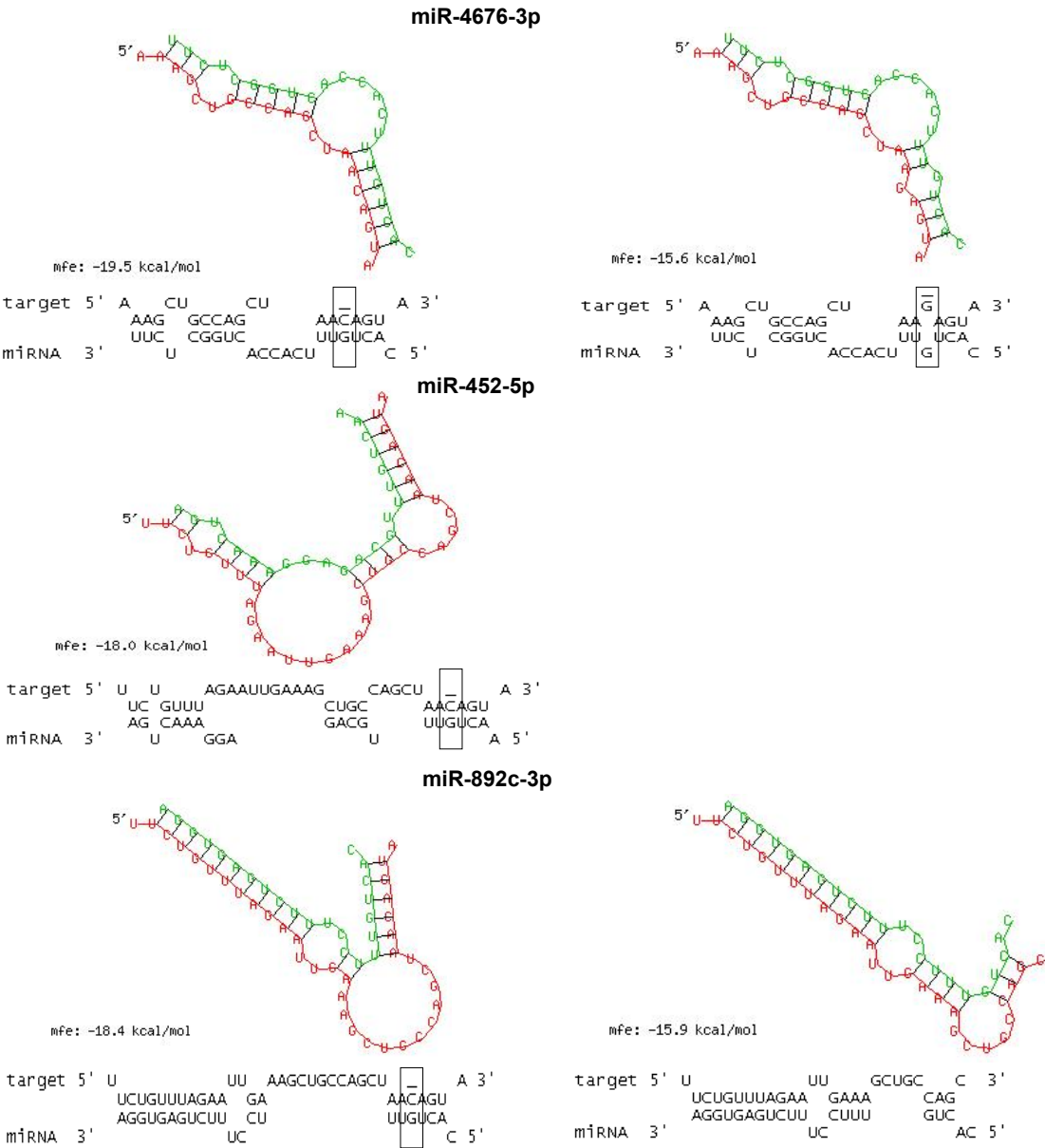


Figura 38. Pérdida de la eficiencia de unión de los tres miARNs a la región 3'UTR causada por la variante rara c.*231C>G del gen PPP2R2B. 38A. Datos de MFE y ΔΔG de la secuencia ancestro y la secuencia con la variante para cada miARN. 38B. Figura que muestra la complementariedad de los distintos miARN con el ARNm dianas ancestral y con la variante. Se marca con un rectángulo la localización de la variante. En las imágenes se puede apreciar la pérdida de la complementariedad de la región “seed” de los miARN con el ARNm en todos los casos.

6. DISCUSIÓN

6.1 Posible papel regulatorio de DNMT3b durante el desarrollo del SNE

El desarrollo del SNE es un proceso complejo que está controlado por un patrón de expresión génica que está determinado por una serie de mecanismos regulatorios a nivel transcripcional, post-transcripcional y epigenético. Cabe destacar que la epigenética está adquiriendo cada vez más un papel dentro del desarrollo del SNE [Torroglosa y cols., 2016]. En este sentido, se ha descrito un descenso de la expresión del gen que codifica para la *de novo* metiltransferasa *DNMT3b* en las CPEs de pacientes HSCR, lo que correlacionó con el descenso de la metilación global de ADN en estos pacientes. Además se identificaron varias mutaciones patogénicas en este gen que actuaban como modificadores de la severidad del fenotipo HSCR [Torroglosa y cols., 2014]. Por todo ello, *DNMT3b* se propone como un gen de susceptibilidad en dicha enfermedad y por tanto su implicación en la formación del SNE.

El mecanismo por el que *DNMT3b* regula la formación del SNE, y por tanto su implicación en la aparición de HSCR es aún desconocido. Con el objetivo de esclarecer el papel de *DNMT3b* en estos procesos se llevó a cabo el silenciamiento de dicha metiltransferasa en CPEs de ratón, y se observó un incremento significativo del número y tamaño de las NLBs. Dicho resultado sugiere un posible papel regulador de *Dnmt3b* sobre la proliferación y/o supervivencia de las EPCs en ratón. En este sentido, ha sido documentado un efecto de *Dnmt3b* sobre la proliferación de células embrionarias de ratón a través de los niveles de metilación de los genes *Nanog* y *Oct3/4*, requeridos ambos para el mantenimiento de la pluripotencia y proliferación de dichas células [Li y cols., 2007; Umehara y cols., 2013]. Por tanto *Dnmt3b* induce la bajada de expresión de dichos genes lo que reduce el índice mitótico de dichas células y contribuye al inicio de su diferenciación [Umehara y cols., 2013]. Este papel descrito de *Dnmt3b* durante el desarrollo embrionario está en concordancia con los resultados que hemos obtenido.

En el ámbito de determinados tumores ha sido ampliamente documentado que la expresión aberrante de *DNMT3b* aumenta la proliferación y/o supervivencia celular, lo que resulta en el crecimiento y progresión del tumor. Por un lado, se ha descrito que la expresión de *DNMT3b* se encuentra reducida en algunos tipos de tumores, lo que se traduce a una hipometilación del ADN que conlleva a la desregulación de la expresión de genes implicados en estos procesos [Gasque Schoof y cols., 2015; Peres y cols., 2016]. Por otro lado, lo que más extensamente se ha descrito en el ámbito tumoral es un aumento de la expresión de *DNMT3b* [Subramaniam y cols., 2014; Megiorni

y cols., 2016; Afgar y cols., 2016], lo que provoca la hipermetilación de regiones promotoras de genes supresores de tumores lo que conlleva al crecimiento tumoral [Subramaniam y cols., 2014]. En este sentido, hay varios estudios que han demostrado que al inducir la bajada de expresión de *DNMT3b* en líneas cancerígenas humanas tiene un efecto antiproliferativos a través de la desmetilación y reactivación de genes supresores de tumores [Beaulieu y cols., 2002; Rhee y cols., 2002; Kassis y cols., 2006; Yaqinuddin y cols., 2008; Hagemann y cols., 2012; Afgar y cols., 2016; Megiorni y cols., 2016].

En base a los resultados obtenidos en este estudio, así como a lo expuesto previamente en el desarrollo embrionario y progresión del cáncer se podría sugerir que *DNMT3b* está metilando y por tanto controlando la expresión de genes involucrados en proliferación, apoptosis y/o diferenciación celular en dichos procesos de forma espacio-temporal dependiente. Concretamente, según los resultados obtenidos en este estudio, el papel de *DNMT3b* sobre las CPEs definido por un patrón de metilación génica determinado podría estar regulando a un nivel antiproliferativo, apoptótico y/o sobre la diferenciación celular, que finalmente conduce a la correcta formación del SNE.

Uno de los posibles mecanismos que podría regular *Dnmt3b* es la diferenciación celular y por ello se estudió el posible efecto de *Dnmt3b* sobre dicho proceso en las CPEs. Para ello, se analizó el porcentaje de diferentes marcadores celulares en los cultivos de NLBs que representan distinto grado de diferenciación en la neurogénesis: Nestina, p75 y β III-Tubulina. Tras dicho análisis, se puede concluir que *Dnmt3b* no regula la capacidad de diferenciación neuronal de las CPEs, lo que muestra que la bajada de expresión de *Dnmt3b* tendría un efecto a nivel de proliferación y/o supervivencia de las CPEs conduciendo al aumento en el tamaño y número de NLBs observado en los cultivos.

Con el objetivo de conocer el mecanismo por el cual *Dnmt3b* estaría regulando la proliferación y/o supervivencia de las CPEs, se estudió la activación de las vías MAPK/ERK, PI3K/Akt y STAT3, así como la expresión de determinadas proteínas reguladoras de la apoptosis celular, BCL-XL y P53 en las distintas condiciones establecidas en los cultivos de NLBs. Se seleccionaron dichas vías debido a su activación en respuesta a la fosforilación de RET [Tansey y cols., 2000; Zhou y Too, 2013; Li y cols., 2016], el principal gen implicado en HSCR [Borrego y cols., 2013]. Además, estas vías han sido ampliamente relacionadas con la proliferación, supervivencia, apoptosis, migración y diferenciación celular. Por otro lado, también se consideraron BCL-XL por su papel anti-apoptótico [Haupt y cols., 2003] y P53 por su papel pro-apoptótico [Shao y cols.,

2000; Kojima y cols., 2005]. En cuanto a las vías de señalización analizadas y BCL-XL, no se observaron cambios significativos en su activación ni expresión respectivamente al comparar con los cultivos control. Sin embargo, en la expresión de *p53* se observó una bajada significativa en los cultivos donde *Dnmt3b* estaba silenciado, por lo que nos llevó a sugerir que la bajada de la expresión de *Dnmt3b* estaría provocando una disminución de la expresión de *p53* que inhibiría la apoptosis celular basal y/o favorecería la entrada en ciclo celular de las CPEs en los cultivos de NLBs.

En el presente estudio, hemos podido correlacionar la bajada de expresión de *Dnmt3b* con una disminución de la expresión de *p53* en las CPEs. Este hallazgo sugiere un posible papel regulador de DNMT3b sobre la expresión de *p53* en el desarrollo de las CCN, donde fallos a este nivel pueden contribuir a la aparición de neurocristopatías como HSCR. En este sentido, Xia y cols., mostró que en embriones mutantes *Eif3ba* de pez cebra hay una pronunciada apoptosis de las CCN craneales lo que correlacionó con la sobreexpresión de *p53*. Este estudio refuerza la importancia de unos niveles de expresión adecuados de *p53* para el correcto desarrollo de las CCN. Recientemente, se ha evidenciado la relación de *p53* con DNMT3b, ya que la hipermetilación de *p53* en respuesta al aumento de expresión de DNMT3b, provoca un descenso de su expresión, conduciendo a un aumento de la proliferación celular [Cao y cols., 2016; Zhou y cols., 2016]. En este sentido Cao y cols., además proponen un efecto directo de DNMT3b sobre *p53* determinando sus niveles de expresión en las células musculares lisas vasculares. En cambio en nuestro estudio por un lado observamos que la bajada de expresión de *Dnmt3b* correlacionaba con una bajada de expresión de *p53*, y por otro lado no se identificó a *p53* como diana de dicha metiltransferasa mediante el estudio de ChIP-Seq, por todo ello proponemos que DNMT3b podría regular a *p53* de forma indirecta en las CPEs. Para obtener un enfoque más completo del posible mecanismo por el que la expresión de *p53* está regulada en las CPEs, se determinó el patrón de expresión de *Mdm2*, un inhibidor directo de *p53* [Bieging y cols., 2014; Prokhorova y cols., 2015]. En este sentido, no se observaron cambios en los niveles de expresión de *Mdm2* en los cultivos silenciados, no siendo este el mecanismo responsable, lo que requiere seguir profundizando a este nivel.

El supresor tumoral P53 es un factor de transcripción que controla el crecimiento celular induciendo la parada del ciclo celular o la entrada en apoptosis dependiendo de numerosos factores, como el nivel de expresión de *p53*, el tipo de señal que induce su expresión, el tipo o el contexto celular, y sus co-activadores que determinan el repertorio de genes diana de P53. El nivel de P53 está regulado principalmente por MDM2 (HDM2 en humanos), que lo inhibe

transcripcionalmente y promueve su degradación por el proteosoma. Cuando las células son sometidas a algún tipo de estrés, como un daño en el ADN, expresión de oncogenes, pérdida del contacto celular, etc... este nivel de P53 aumenta [Haupt y cols., 2003]. En este sentido, el factor de transcripción P53 regula ambos procesos mediante la activación transcripcional de sus genes diana, siendo algunos de ellos los genes *p21*, *Puma* y *Bax*. A través de la activación de *p21*, P53 desencadena la detención en G1 del ciclo celular, en cambio la inducción de la expresión de *Puma* y *Bax* origina el inicio de la respuesta apoptótica [Bieging y cols., 2014; Prokhorova y cols., 2015]. La apoptosis mediada por P53 se lleva a cabo a través de dos vías diferentes, la vía extrínseca e intrínseca. La vía extrínseca se activa a través de receptores de membrana que provoca la cascada de activación de determinadas caspasas, entre las que se encuentra la caspasa-8. La vía intrínseca, es la vía mitocondrial activada por una serie de genes a los que pertenecen *Bax* y *Puma*, que promueven la formación del apoptosoma, lo cual a su vez promueve la activación de las caspasas efectoras (caspasa-3, caspasa-6 y caspasa-7) (Figura 40) [Haupt y cols., 2003].

Por tanto, por un lado es necesario determinar cual es el mecanismo operativo en las CPEs que desencadena el aumento del crecimiento celular observado en respuesta a la bajada de expresión de *p53-Dnmt3b*. Para ello se examinó el patrón de expresión de algunas dianas de P53, en concreto *p21*, implicado en la regulación del ciclo celular, y de *Puma* y *Bax*, que inducen la apoptosis [Bieging y cols., 2014; Prokhorova y cols., 2015], permitiéndonos discernir entre ambos procesos. Por otro lado, en caso de que la apoptosis sea el mecanismo efector por el que P53 actúa en el desarrollo en las CPEs, sería interesante diferenciar si es a través de la vía extrínseca o intrínseca, con este objetivo se determinó también el patrón de expresión de la *caspasa-8* y la *caspasa-6*. Ambas vías apoptóticas reguladas por P53 y los genes analizados dentro de las mismas se muestran en la figura 39.

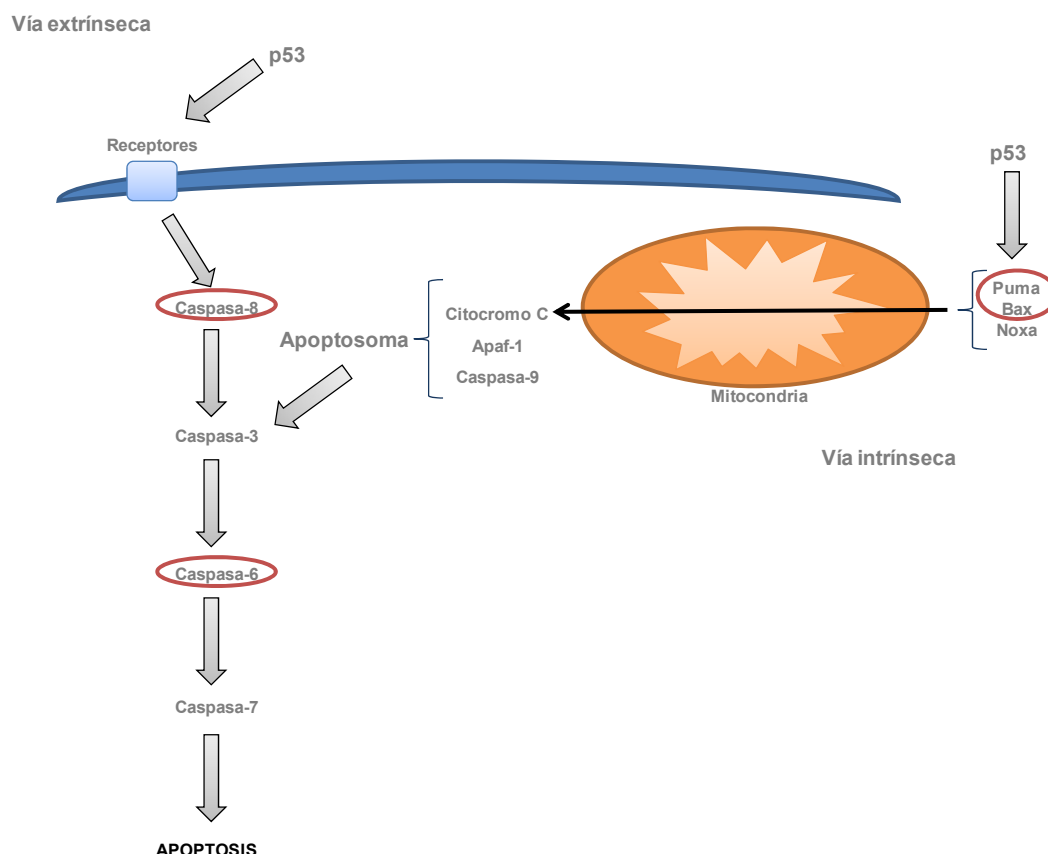


Figura 39. Diagrama que muestra las vías extrínseca/intrínseca activadas por p53 que regulan la apoptosis celular, así como los elementos efectores de ambas. Los genes seleccionados para el estudio de expresión con el objetivo de esclarecer los posibles mecanismos apoptóticos regulados por DNMT3b-P53 en las CPEs están resaltados.

Tras analizar los niveles de expresión de *p21*, *Casp6*, *Casp8*, *Bax* y *Puma* se detectó un descenso en los niveles de expresión de *p21*, por el contrario no hubo cambios en *Casp6*, *Casp8*, *Bax* y *Puma*, lo que nos permite proponer el posible papel de DNMT3b como regulador del ciclo celular a través de la actividad P53-P21 y descartar la vía apoptótica. Esto nos permite concluir que el aumento del número y tamaño de las NLBs tras silenciar *Dnmt3b* en CPEs parece deberse a una desregulación en la entrada del ciclo celular de manera P53-P21 dependiente, lo que nos sugiere la posible implicación de este mecanismo en la aparición de HSCR. Para consolidar dicha hipótesis, se comprobó los niveles de expresión de *P53* y *P21* en las CPEs de aquellos pacientes HSCR donde previamente se detectó por Torroglosa y cols., una bajada de expresión de *Dnmt3b* con respecto a individuos control. En estos pacientes se detectó también la bajada de expresión en ambos genes, y por tanto confirmando que la expresión aberrante de *DNMT3b* en estos pacientes desregula la expresión de *P53* y *P21* y todo ello conduce a una alteración a nivel de ciclo celular y podría contribuir a la aparición de la enfermedad.

El ciclo celular es un proceso finamente regulado por un amplio número de proteínas entre las que se encuentran las ciclinas e inhibidores específicos de las mismas. Entre estos inhibidores se encuentra P21, el cual induce una parada permanente del ciclo celular en G1 [Wiman y Zhivotovsky, 2017]. La senescencia celular se define como parada de ciclo celular que ocurre en respuesta a daño/estrés asociado a estados patológicos, cáncer, envejecimiento y también en el desarrollo embrionario de mamíferos. En este último caso se conoce como senescencia programada, ampliando el término senescencia a un proceso fisiológico que ocurre en respuesta a señales del desarrollo embrionario, entre las que P21 juega un papel crucial. Por tanto, la senescencia celular se suma a la colección de procesos que contribuyen al desarrollo embrionario, junto con la proliferación, diferenciación, migración y muerte celular [Muñoz-Espín y cols., 2013; Storer y cols., 2013]. La identificación del posible papel regulador de P21 en el desarrollo del SNE y por tanto en HSCR nos permite añadir la senescencia programada como un mecanismo que opera junto con los ampliamente conocidos en dichos procesos.

La senescencia celular tiene lugar en diferentes tejidos y localizaciones a lo largo del embrión, entre ellos se incluye el tubo neural [Storer y cols., 2013]. Durante el desarrollo del SN la proliferación y senescencia se regulan cuidadosamente para asegurar que se genere el número apropiado de células. El balance entre estos dos procesos determina el crecimiento de la población neural para la correcta formación del SN [Siegenthaler y Miller, 2005]. En este sentido, también se ha descrito que es necesario un número crítico de CCN para la correcta formación del SNE [Wallace y cols., 2009]. Según los resultados obtenidos en este estudio en los que obtenemos un número aberrante de CPEs en respuesta a la bajada de DNMT3b/P53/P21 y que dicha bajada se ha observado en pacientes HSCR, proponemos posibles mecanismos subyacentes que podrían contribuir a la aparición de la enfermedad y por tanto a la falta de la correcta colonización del intestino debido a alteraciones en el control de la senescencia; 1) la desregulación de la senescencia como un mecanismo que asegura el mantenimiento y capacidad de renovación de las células madres neurales a largo plazo [Kippin y cols., 2005], en este sentido la disminución transcripcional de *p21* en las células precursoras neurales promueve una proliferación aberrante de las mismas [Kippin y cols., 2005; Theriault y cols., 2005; Sun y cols., 2007], lo que podría conllevar a la pérdida de su mantenimiento y capacidad de autorrenovación, resultando en su agotamiento prematuro; 2) la presencia de células precursoras defectuosas durante la colonización del intestino debido a la ausencia de control de proliferación sobre dichas células; 3) retraso/ausencia en la colonización debido a la mayor competencia de nutrientes por parte de las corrientes celulares migratorias.

Resumiendo, el control del ciclo celular es un proceso fisiológico requerido para el correcto desarrollo embrionario del SNE, en este sentido nuestro estudio es el primero en identificar un mecanismo regulador del ciclo celular de las CPEs protagonizado por la actividad de DNMT3b-P53-P21. Alteraciones en dicho mecanismo podría en consecuencia dar lugar a fallos en el control del ciclo celular de las CPEs, evitando la correcta formación del SNE y contribuyendo a la aparición de HSCR. Por tanto, este estudio es un punto de partida que promueve a una investigación más detallada del control del ciclo celular a un nivel epigenético así como los mecanismos subyacentes específicos que desencadenarían la enfermedad.

6.2 Identificación de nuevos genes implicados en la correcta formación del SNE y en la enfermedad de HSCR

Con el objetivo de aclarar cómo los mecanismos epigenéticos mediados por DNMT3b regulan la formación del SNE y definir el patrón de expresión génica requerido a este nivel, se llevó a cabo el estudio para la identificación de genes diana de DNMT3b que permitió conocer los genes y vías reguladas por esta metiltransferasa. Tras identificar las dianas, se realizó un estudio para comprobar su patrón de expresión en CPEs humanas, y se observó la ausencia o leve expresión en la mayoría de dichas dianas, posiblemente debido a la posible acción represora que DNMT3b ejerce sobre éstas. Las funciones descritas para estas dianas son diversas (Tabla 26), aunque la mayoría de ellos comparten un papel en migración, proliferación, apoptosis y/o diferenciación celular, en algunos casos en células neuronales o CCN así como durante el desarrollo del SN, lo que sugiere la posible implicación de estos genes en el desarrollo del SNE.

Para comprobar la posible implicación en HSCR de las dianas de DNMT3b, se realizó un estudio de expresión diferencial entre las CPEs de pacientes HSCR en comparación con individuos control. Adicionalmente se consideraron 5 genes por su implicación en el desarrollo y por su relación con algunas de estas dianas. Por otro lado, se llevó a cabo la búsqueda de variantes exónicas raras en nuestra cohorte de paciente HSCR tanto en las dianas como en los genes adicionales. Se encontraron diferencialmente expresados de manera significativa 9 genes y el pseudogén *RP11-220D10*, siendo *KPNA1*, *SULF1*, *CDK5RAP2*, *BBX*, *DRG1*, *RAB10*, *MYDGF* y *RNA45S5* los genes dianas de DNMT3b y *EED* un gen relacionado con las dianas *KPNA1* y *PPP2R2*. Cabe destacar el hecho de que todos los genes y el pseudogén estaban sobreexpresados en pacientes HSCR, lo que encaja con la disminución de la metilación global del ADN debido a la

bajada de la expresión de *DNMT3b* descrita en pacientes HSCR [Torroglosa y cols., 2014] (Figura 40). Tras la búsqueda de variantes en el exoma de pacientes se detectaron variantes raras con penetrancia incompleta en 5 de estos genes (*BBX*, *SULF1*, *RAB10*, *PPP2R2B*, *CDK5RAP2*), las cuales podrían contribuir de una manera aditiva o multiplicativa al fenotipo HSCR. La mayoría de todos estos genes con posible papel en HSCR se han relacionado previamente de forma directa o indirecta con el desarrollo de las CCN, con la formación del SNC o el SNE.

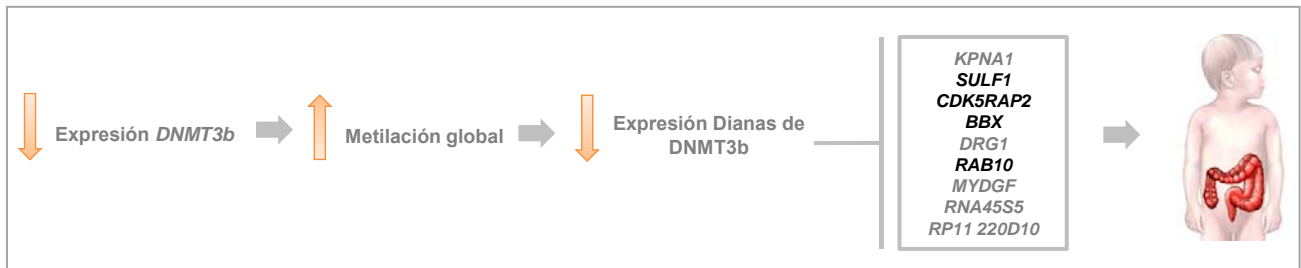


Figura 40. Modelo propuesto para DNMT3b y mecanismos epigenéticos en la aparición de HSCR. En negro aparecen aquellos genes diferencialmente expresados en CPEs y con variantes exónicas raras detectadas en nuestra cohorte de pacientes.

Tabla 26. Funciones descritas para las dianas de DNTM3b identificadas en las CPEs.

Genes	Adhesión / Migración	Proliferación	Apoptosis	Diferenciación	Desarrollo SN	Otras funciones
<i>RN45S</i>						Regulado por metilación durante el desarrollo embrionario del ratón [Sánchez-Martín y cols., 2015]
<i>CH507-528H12.1</i>						
<i>CH507-513H4.4</i>						
<i>DPP9</i>			X			
<i>MYO7A</i>				X		Desarrollo, organización y diferenciación de las células del sistema auditivo y visual
<i>ANO2</i>					X [Rock y Harfe, 2008]	Transporte iónico
<i>LINC01603</i>						
<i>MYDGF</i>		X	X			
<i>KPNA1</i>			X			Importación de proteínas al núcleo
<i>RP11-220D10.1</i>						
<i>CHL1</i>	X (neuronal)		X (neuronal)	X	X	Orientación y regeneración axonal
<i>CYR61</i>	X	X	X	X		
<i>GPHN</i>						Sinapsis y establecimiento de especificidad sináptica en la unión neuromuscular
<i>BBX</i>					X [Dixon y cols., 2013]	Promueve la transición de G1/S en levaduras [Sánchez-Díaz y cols. 2001]
<i>KIAA0825</i>						
<i>SULF1</i>	X (CCN) [Guiral y cols., 2010]	X	X			Contracción del músculo liso del esófago, vía de señalización de GDNF e innervación
<i>LY75</i>		X				Respuesta inflamatoria, respuesta inmune y endocitosis
<i>RAB10</i>	X [Deen y cols., 2014]	X [Lv y cols., 2015]			X	Axonogénesis, establecimiento de la polaridad neuroblástica, secreción y transporte de proteínas
<i>DRG1</i>		X (neuronal) [Sazuka y cols., 1992]		X (neuronal) [Sazuka y cols., 1992]	X [Kumar y cols., 1992; Sazuka y cols., 1992]	Desarrollo de organismos multicelulares
<i>EIF4ENIF1</i>				X (neuronal)		Mantenimiento de células madre
<i>SFI1</i>		X				Ciclo celular mitótico, transición G2 / M del ciclo celular mitótico. Regulado por metilación durante el desarrollo embrionario del ratón [Sánchez-Martín y cols., 2015]
<i>PPP2R2B</i>		X	X (neuronal)	X (neuronal)	X	
<i>DOPEY2</i>					X [Lopes y cols., 2003]	Asociado a las anomalías cerebrales y al retraso mental en Síndrome de Down [Rachidi y cols., 2006]
<i>SMO</i>	X (CCN)	X	X	X (neuronal)	X	Desarrollo del tracto digestivo, activación de astrocitos, guía axonal, patrón dorsal / ventral del tubo neural, mantenimiento de las células madre embrionarias y regulación de la TEM
<i>LITAF</i>			X			Respuesta inflamatoria
<i>CDK5RAP2</i>		X		X	X	Regulación negativa de la neurogénesis
<i>LIMD1</i>	X			X		Desarrollo de organismos multicelulares. Desarrollo de la cresta neural [Langer y cols., 2008]
<i>C10orf67</i>						Asociado con la enfermedad de Crohn [Franke y cols., 2008]
<i>TMEM125</i>						

Funciones obtenidas mediante la herramienta IPA

[REF]= Referencias de aquellas funciones obtenidas de manera externa a la herramienta IPA

6.2.1 Diferentes tipos de regiones genómicas como sitios de unión de DNMT3b a los genes dianas con posible papel en HSCR

Los picos obtenidos que representaron las regiones diana de DNMT3b en CPEs revelaron que dicha *de novo* metiltransferasa se une preferentemente a regiones intergénicas e intrónicas, siendo el 1,5% de los casos regiones promotoras. En este sentido, los sitios de unión de DNMT3b a los 9 genes diferencialmente expresados en HSCR correspondieron a regiones promotoras, intrónicas e intergénicas (aguas arriba y aguas abajo) como se puede apreciar en la Figura 41.

Por otro lado, analizamos la presencia islas CpG en las regiones de unión a cada uno de estos genes con la herramienta “*Sequence Manipulation Suite: CpG Islands*”. Se observaron islas CpG en las regiones promotoras de los genes *Rn45s* y *Kpna1*, en cambio en el resto de estos 9 genes los sitios de unión fueron regiones intrónicas e intergénica donde no se identificaron regiones ricas en dinucleótidos CG (Figura 42), lo que concuerda con lo descrito en la bibliografía en cuanto a la localización genómica de las islas CpG [Jones, 2012].

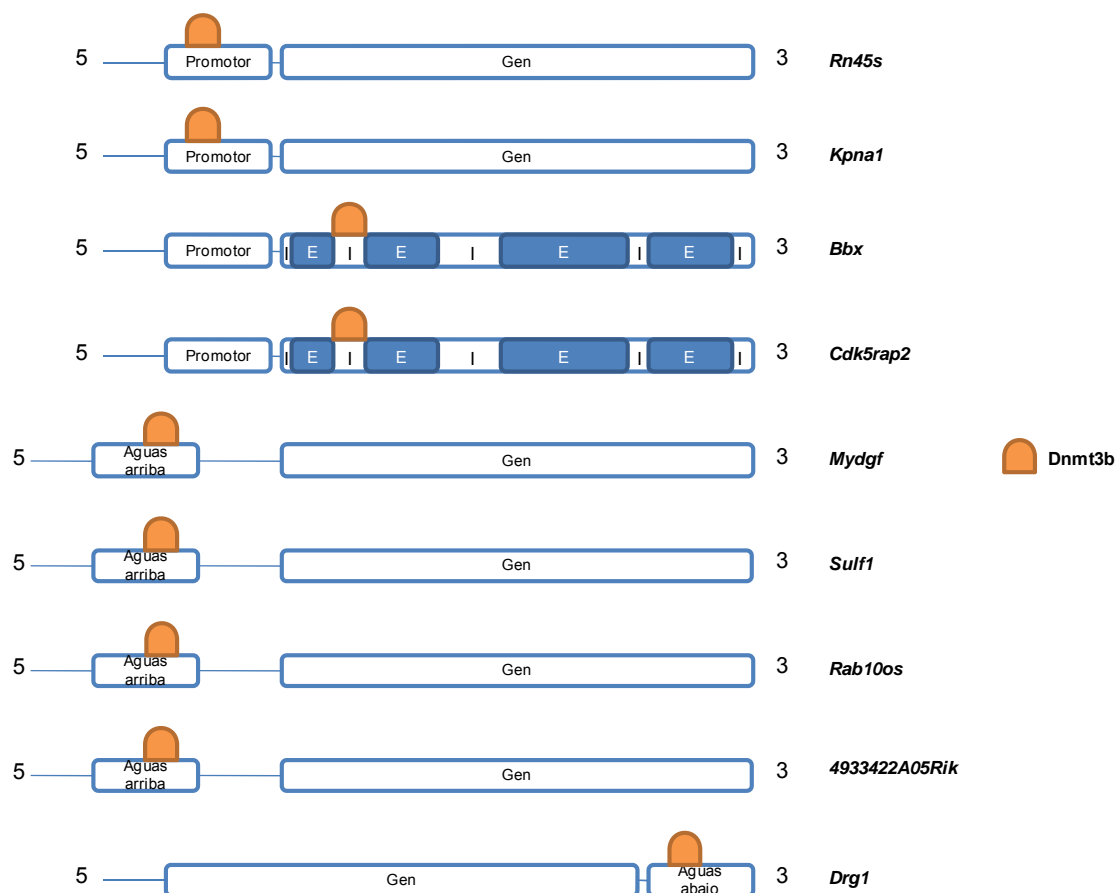
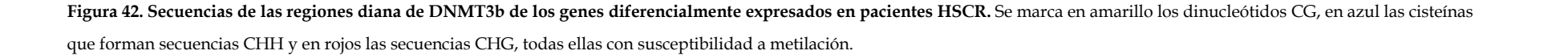


Figura 41. Imagen representativa de las regiones de unión de DNMT3b a los genes sobreexpresados en pacientes HSCR.

Interesantemente, en células madre embrionarias pluripotentes de mamífero se ha descrito una metilación preferencial en regiones intragénicas no enriquecidas en dinucleótidos CG, ocurriendo dicha metilación en el contexto nucleotídico CHG o CHH (donde H es A, C o T). Este mecanismo epigenético desaparece cuando dichas células adquieren un grado de diferenciación y se restaura en células pluripotentes inducidas, por lo que podría tener un papel clave en el origen y mantenimiento del estado pluripotente [Lister y cols., 2009]. También se ha mostrado la importancia en la regulación de la expresión génica de los dinucleótidos CG localizados en regiones intrónicas a través de su metilación [Unoki y Nakamura, 2003; Ortmann y cols., 2008; Zhang y cols., 2010], incluso la metilación de un sólo dinucleótido CG situado en dicha región puede ejercer el papel regulador citado anteriormente [Zhang y cols., 2010]. Por otro lado, las regiones potenciadoras de la expresión génica situadas a una distancia variable del promotor son frecuentemente pobres en CG pero se ha identificado que su actividad puede ser regulada por la metilación [Jones, 2012]. Todas estas evidencias nos permitiría proponer a las regiones no promotoras identificadas en nuestro estudio como sitios de unión de dicha *de novo* metiltransferasa como posibles regiones reguladoras de la expresión génica. En este sentido, hay un estudio reciente que apoya y describe la importancia de la metilación de regiones promotoras y no promotoras como mecanismos diferentes para la regulación de la expresión génica, concretamente describen que la bajada de la metilación en ambas regiones resultan en la sobreexpresión de un conjunto de genes [Blattler y cols., 2014]. Nuestro estudio ha evidenciado que en el caso de los genes *Rn45s* y *Kpna1*, DNMT3b tiene su sitio de unión en la región promotora y las regiones de unión a los genes *Bbx*, *Cdk5rap2*, *Mydgf*, *Sulf1*, *Rab10os*, *2210408I21Rik* y *Drg1* presentan una densidad de CpG mucho menor, aunque hay secuencias CHG y CHH posiblemente susceptibles de metilación como se puede ver en la figura 43. Concluyendo, la bajada de expresión de DNMT3b y de la metilación global del ADN observada en los precursores de pacientes HSCR concuerda con el aumento de expresión encontrado en los genes diana de esta proteína, lo que sugiere que DNMT3b ejerce un papel represor sobre estos genes a través de los dos mecanismos citados.



6.2.2 Las dianas de DNMT3b identificadas en los precursores entéricos ponen de manifiesto una diversidad de mecanismos a través de los cuales regulan los procesos celulares implicados en el correcto desarrollo del SNE y por tanto su papel en HSCR

Los genes dianas de DNMT3b identificados en las CPEs y con un posible papel en la aparición de HSCR, se han relacionado con los diferentes procesos celulares ampliamente implicados en el desarrollo embrionario a través de diversos mecanismos. En este sentido, entre los genes obtenidos se encuentran factores de crecimiento (*MYDGF*), endosulfatas que regulan la activación de una variedad de vías de señalización (*SULF1*), receptores requeridos para el transporte nuclear de proteínas que controlan la expresión génica (*KPNA1*), proteínas centrosomales esenciales para el correcto ciclo celular mitótico (*CDK5RAP2*), RAB GTPasas que coordinan de manera espacio-temporal algunas de las etapas del tráfico intracelular de vesículas en células eucariotas (*RAB10*) y DRG GTPasas que interaccionan con proteínas involucradas en el control del ciclo celular mitótico (*DRG1*), factores de transcripción de la familia SOX (*BBX*), genes ribosomales precursores de las subunidades ribosómicas 18S, 5.8S y 28S (*RNA45S5*) y pseudogenes procesados (*RP11-220D10.1*). Por tanto, DNMT3b podría estar implicado en la aparición de la enfermedad mediante la alteración de cualquiera de estos mecanismos mediados por la actividad de estas dianas.

6.2.2.1 *MYDGF*

MYDGF codifica para el factor de crecimiento derivado mieloide, el cual no ha sido relacionado previamente con el desarrollo o la formación del SN, siendo este estudio el primero que lo relaciona con un posible papel en el desarrollo de las CPEs humanas y por tanto del SNE. En este sentido, Korf-Klingebiel y cols., han descrito que *MYDGF* promueve la supervivencia de miocitos cardíacos y la proliferación de células endoteliales. De manera similar se ha documentado que la sobreexpresión de este gen en células de hepatocarcinoma aumenta la proliferación de dichas células [Sunagozaka y cols., 2011]. Recientemente Dwivedi y cols., propone que *MYDGF* es sintetizada por varios tipos celulares, ya que observaron mediante un análisis proteómico la presencia de *MYDGF* en varias líneas celulares. En base a estos estudios y teniendo en cuenta los resultados obtenidos, podemos sugerir el posible papel de *MYDGF* en la proliferación y/o supervivencia celular durante el desarrollo del SNE. Por tanto, el aumento de la expresión de *MYDGF* podría contribuir al aberrante crecimiento de las CPEs.

6.2.2.2 *SULF1*

SULF1 codifica para la endosulfata 6-O-N-acetylglucosamina, una enzima que elimina específicamente los grupos sulfato de las cadenas de heparán sulfato (HS) unidas covalentemente a un núcleo proteico de la matriz extracelular, lo que se conoce como proteoglicanos heparán sulfato (HSPG). La superficie celular posee un patrón de sulfatación específico el cual es remodelado por dicha enzima, cambiando la afinidad de los ligandos y receptores al HS y regulando una variedad de vías de señalización celular esenciales en el desarrollo embrionario [Lin, 2004]. Se han descrito una serie de vías de señalización cruciales en el desarrollo de la cresta neural [Fu y cols., 2004; Stuhlmiller y García-Castro, 2012; Lake y Heuckeroth, 2013] dependientes de HS sulfatación del HS, entre las que se encuentran Wnt, Hedgehog, FGF, BMP y GDNF [Wang y cols., 2004; Ai y cols., 2006; Ai y cols., 2007; Al Oustah y cols., 2014; Ramsbottom y cols., 2014].

Varios estudios han mostrado el papel de *Sulf1* en el desarrollo de la cresta neural y SNE a través de la modulación de vías de señalización implicadas en estos procesos. Guiral y cols., muestran en embriones de *Xenopus* que *Sulf1* es esencial para la correcta migración de las CCN craneales al remodelar la superficie celular y proporcionar las interacciones esenciales para la migración dirigida de estas células. En este sentido también se muestra en *Xenopus* que *Sulf1* es importante para la señalización dependiente del gen *Shh* en el desarrollo del tubo neural, ya que es requerido para establecer el patrón dorsal-ventral en el tubo neural y para la proliferación de las células progenitoras [Ramsbottom y cols., 2014]. Además son varios estudios los que permiten correlacionar el patrón de expresión de *Sulf1* con el patrón de colonización por parte de las CCN [Young y cols., 1998; Ai y cols., 2007; Lum y cols., 2007], lo que conduce a proponerlo como un gen necesario para el desarrollo del SNE. Ai y cols., observaron en el ratón doble mutante *Sulf1*^{-/-}; *Sulf2*^{-/-} una muerte temprana tras el nacimiento y defectos en la innervación neuronal en el esófago dando lugar a fallos en la contractibilidad del músculo liso a este nivel. En este mismo estudio demuestran que *Sulf1* y *Sulf2* son requeridos para la señalización mediada por GDNF durante el proceso de innervación del esófago y por tanto fallos a este nivel son los responsables de la aparición del fenotipo mutante [Ai y cols., 2007]. En cuanto al papel de GDNF en el SN se ha descrito que no sólo promueve la proliferación de las CPEs de la cresta neural [Heuckeroth y cols., 1998], sino que además actúa como quimioatrayente para dirigir correctamente las extensiones de las neuritas al tejido diana [Young y cols., 2001]. Ha sido mostrado que *Sulf1* es expresado durante el desarrollo embrionario (E14-E16) por los progenitores musculares, lo que promueve el crecimiento de las neuritas dependiente de GDNF de los progenitores neuronales que expresan *Sulf2*. Se *Sulf1* el que es requerido. Concretamente se ha documentado que *Sulf1* controla la

afinidad de GDNF por el HS, disminuyendo su interacción en la matriz extracelular lo que podría facilitar la unión al receptor RET en neuronas receptoras de GDNF [Ai y cols., 2007]. Por todo lo descrito, hipotetizamos que *Sulf1* podría regular la innervación neuronal de los músculos a lo largo del tracto gastrointestinal de forma DNMT3b-SULF1-GDNF-RET dependiente, lo que nos lleva a proponer que fallos en dicho mecanismo a nivel del SNE podría contribuir a la aparición de HSCR (Figura 43).

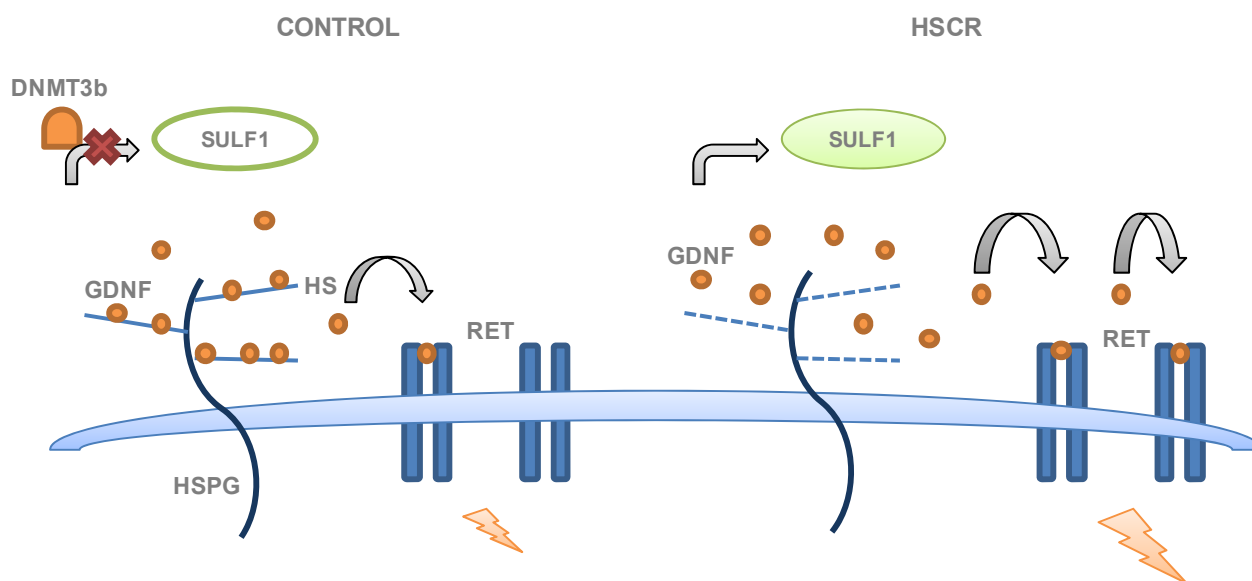


Figura 43. Figura que representa el mecanismo por el que la vía planteada DNMT3b-SULF1-GDNF-RET podría contribuir a la aparición de la enfermedad. GDNF tiene una alta afinidad a las cadenas de HS sulfatadas en la superficie celular de las CPEs, lo que regula su interacción con RET (cadenas HS sulfatadas representadas con líneas continuas) para la correcta formación del SNE (CONTROL). La desulfatación por SULF1 (Cadenas HS no sulfatadas representadas como líneas discontinuas) disminuye la afinidad HS/GDNF liberándose GDNF y permitiendo la unión de GDNF a su receptor de forma aberrante, lo que activaría de forma descontrolada la casacada de señalización contribuyendo a HSCR.

6.2.2.3 *KPNA1*

Este gen codifica para la karyopherina (KPNA) alpha1 que pertenece a la familia de las importina-alpha, que son receptores requeridos para el transporte al interior del núcleo de proteínas (factores de transcripción, factores remodeladores de cromatina,...) que regulan la expresión génica. La localización celular de estas proteínas que ejercen su función en el núcleo debe estar controlada de manera rigurosa, por lo que alteraciones en la importación o exportación nuclear podría resultar en una expresión génica aberrante afectando a la función celular [Choo y cols., 2016]. Cada miembro de la familia de las importina-alpha tiene una afinidad selectiva para

las diferentes proteínas diana [Kohler y cols., 1999], siendo la concentración de cada KPNA determinante para el ritmo de transporte de estas proteínas. Concretamente, KPNA1 interacciona aproximadamente con unas 30 proteínas en humanos, estando más de la mitad implicadas en procesos de transcripción y metabolismo del ARN, lo que permite proponer que KPNA1 debe tener un papel importante en la regulación de la expresión génica [Choo y cols., 2016]. Interesantemente, una de las proteínas que requieren de la interacción con KPNA1 para su transporte al núcleo es STAT3 [Ma y Cao, 2006; Bao y cols., 2014; Choo y cols., 2016]. Este factor de transcripción se ha relacionado principalmente con la proliferación y apoptosis entre otros procesos celulares [Konnikova y cols., 2003; Al Zaid Siddiquee y Turkson, 2008]. Además, ha sido relacionado con la coordinación del ciclo celular y la especificación de la cresta neural durante el desarrollo [Nichane y cols., 2010]. Cabe mencionar que la activación de la vía STAT3 es desencadenada por la fosforilación del receptor RET [Schuringa y cols., 2001; Zhou y Too, 2013]. En el presente estudio se ha observado que *STAT3* está expresado en CPEs de humanos lo que nos permite sugerir que dicho gen podría tener una función en el desarrollo del SNE. En este sentido hemos observado una expresión elevada de *KPNA1* en los pacientes HSCR, por lo que podría estar favoreciéndose la entrada descontrolada de STAT3 al núcleo, provocando una desregulación en la expresión de sus genes diana con las respectivas consecuencias a nivel celular, que podría correlacionar con lo observado en los cultivos de CPEs tras silenciar *Dnmt3b*. El mecanismo propuesto ha sido mostrado recientemente por Choo y cols., en células satélite musculares de ratón, donde la ausencia de KPNA1 provoca la alteración de la localización nuclear de varias de sus proteínas diana (LEF1 y p27).

Por otro lado, otra proteína transportada por KPNA1 al núcleo es EED [Foust y cols., 2012]. EED, junto con SUZ12 y EZH2 forma el complejo represivo PRC2, el cual media la metilación de la lisina 27 del la histona H3 (H3K27), una marca epigenética asociada con la represión transcripcional [Trojer y Reinberg, 2006]. La mayoría de este tipo de complejos proteicos que modelan la cromatina dando lugar a la represión transcripcional de sus genes diana, interaccionan con el DNA a través de los factores de transcripción entre otras proteínas [Satijn y cols., 2001]. En este sentido, varios estudios han documentado la relación de PRC2 con factores de transcripción para controlar el programa de transcripción de la cresta neural. PRC2 coopera con el factor de transcripción Snail2/Slug para controlar la expresión de genes importantes para la especificación y migración de las CCN durante el desarrollo en *Xenopus*, como *FoxD3*, *Sox9*, *Sox10* y *Twist* [Tien y cols., 2015]. Otro factor de transcripción que interacciona PRC2 es YY1, el cual es esencial para el desarrollo de la cresta neural al activar o reprimir la expresión de genes necesarios para la

especificación de la cresta neural, como el gen *Slug* [Satijn y cols., 2001; Morgan y cols., 2004].

Cabe destacar que también se ha detectado la expresión de *EED* en CPes humanos, y que su expresión era significativamente mayor en precursores de pacientes HSCR con respecto a individuos control. Estos elevados niveles de expresión de *EED* que se han encontrado en pacientes HSCR podrían correlacionar con la probable mayor localización de STAT3 en el núcleo provocada por la elevada expresión de *KPNA1* en estos pacientes. Esta hipótesis está basada en el hecho documentado de que *Eed* es diana de STAT3 y regula su expresión a nivel transcripcional [Ura y cols., 2008], por lo que si una mayor proporción de STAT3 accede al núcleo desencadenaría una mayor expresión de sus genes diana como *EED* entre otros. Como se ha citado anteriormente, *EED* también depende de *KPNA1* para su entrada al núcleo, dando lugar a una mayor proporción de *EED* nuclear, lo que provocaría alteraciones en la expresión de los genes regulados por el complejo PRC2. Por tanto el descenso de la expresión de *DNMT3b* observado en los pacientes HSCR, provocaría un aumento de los niveles de *KPNA1*, lo que se traduce en un aumento de la presencia de STAT3 y *EED* en el núcleo, que finalmente resultaría en alteraciones en la expresión de sus genes diana en las CCN y de esta forma contribuir a la aparición de la enfermedad (Figura 44).

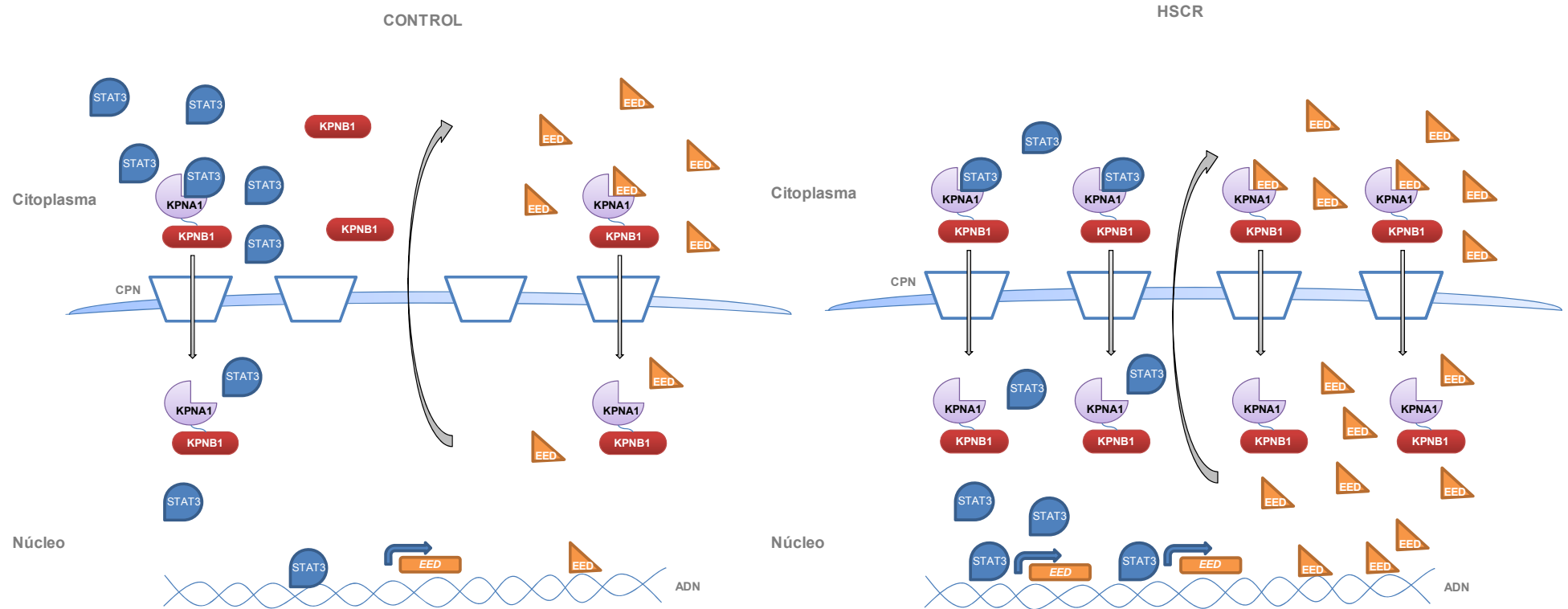


Figura 44. Mecanismo propuesto por el cual el aumento de la expresión de KPNA1 podría contribuir a la aparición de HSCR. KPNA1 junto con KPNB1 forman un complejo que permite denominarlo poro nuclear (CPN) a través del cual pasan proteínas reguladoras de la transcripción (STAT3 y EED). Una vez en el núcleo dichas proteínas se liberan para realizar su función.

6.2.2.4 CDK5RAP2

Este gen codifica para la proteína *cyclin-dependent kinase 5 related activator protein 2*, proteína centrosomal esencial para el correcto ciclo celular mitótico, concretamente tiene un papel importante para la organización de los microtúbulos del centrosoma.

Tanto en embriones de ratón como de humanos, el perfil de expresión de *CDK5RAP2* es similar y es de interés resaltar su expresión en el intestino de ambas especies en dicho estadio. Además se localiza en regiones de alta proliferación celular del cerebro en desarrollo, descendiendo su expresión tras el nacimiento. Por tanto, *CDK5RAP2* tiene un papel conservado en el desarrollo de mamíferos [Issa y cols., 2013]. Varios estudios sugieren un papel de *CDK5RAP2* en la proliferación de progenitores neurales embrionarios durante la neurogénesis [Bond y cols., 2005; Buchman y cols., 2010; Lizarraga y cols., 2010; Issa y cols., 2013]. Mutaciones en *Cdk5rap2* han sido asociadas con microcefalia primaria humana (MCPH), un desorden del neurodesarrollo caracterizado por un reducido tamaño del cerebro [Bond y cols., 2005; Lizarraga y cols., 2010; Sukumaran y cols., 2016], el cual es provocado por alteraciones en la proliferación, migración y/o diferenciación de los progenitores neurales durante el desarrollo del cerebro [Faheem y cols., 2015]. En este sentido, también se ha visto que ratones mutantes para *Cdk5rap2* muestran una microcefalia debido a defectos proliferativos y de supervivencia en progenitores neuronales durante la neurogénesis [Lizarraga y cols., 2010]. El presente estudio revela la expresión de *CDK5RAP2* en CPEs de humano y que dicha expresión se encuentra aumentada significativamente en pacientes HSCR con respecto a los controles. Lo que nos permite sugerir que *CDK5RAP2* podría jugar un importante papel en la neurogénesis durante el desarrollo del SNE.

6.2.2.5 RAB10

RAB10 es un miembro de la familia de los oncogenes RAB GTPasas, constituida por GTPasas que están asociadas a las membranas de los distintos orgánulos de células eucariotas y coordinan espacio-temporalmente las etapas del tráfico de vesículas (formación y transporte de vesículas, clasificación de carga y el acoplamiento y fusión a las membranas diana). Esta función la realizan mediante la interacción con otras proteínas efectoras; como adaptadores específicos, factores de anclaje, quinasas, fosfatasa y proteínas motoras [Stenmark, 2009]. La regulación del tráfico intracelular es esencial para la activación de vías de señalización importantes para el correcto desarrollo embrionario de múltiples organismos, como son las vías de señalización de Hedgehog y Wnt [Furthauer y González-Gaitán, 2009]. En concreto, RAB10 está presente en el retículo endoplasmático, aparato de Golgi, endosoma temprano y reciclado, regulando principalmente el

tráfico Golgi-membrana plasmática y el reciclaje endocítico [Wang y cols., 2011; Liu y cols., 2013; Deen et al., 2014; Zou y cols., 2015]. Recientemente se ha demostrado que *Rab10* es esencial para la embriogénesis temprana en mamíferos, ya que el doble mutante *Rab10^{-/-}* muere prematuramente en el E9.5. Dichos embriones *Rab10^{-/-}* muestran defectos proliferativos (reducción en el número de células y en el tamaño de sus núcleos), lo que se ha relacionado con los defectos en el tráfico endosomal en estos mutantes, poniendo en evidencia la posible relación entre ambos procesos [Lv y cols., 2015]. También a través del tráfico vesicular mediado por Rab10 se ha mostrado su implicación en la adhesión celular [Deen et al., 2014].

Por otro lado, se ha evidenciado que *Rab10* es esencial para el correcto desarrollo neuronal en mamíferos. En este sentido, *Rab10* promueve el crecimiento axonal en el cerebro en desarrollo ya que dirige a los receptores axonales a la membrana plasmática para la respuesta a los factores de crecimiento por las neuronas [Wang y cols., 2011; Liu y cols., 2013; Deng y cols., 2014; Xu y cols., 2014]. En la misma línea, este gen regula el transporte de proteínas requeridas para el crecimiento dendrítico, ya que la pérdida de Rab10 provoca una reducción severa de la ramificación y crecimiento dendrítico en *C. Elegans* y *Drosophila* y mamíferos, lo que evidencia la importancia del papel conservado de RAB10 en el control del tráfico de vesículas para la correcta morfogénesis dendrítica en el desarrollo neuronal [Zou y cols., 2015]. Por tanto, RAB10 es necesario para la correcta morfogénesis neuronal y la sinapsis, lo que demuestra que esta proteína es esencial para un correcto desarrollo y funcionamiento del Sistema Nervioso. En este sentido, nuestro estudio muestra la expresión de *RAB10* en las CPEs de humanos lo que sugiere que *RAB10* puede tener un papel similar en el desarrollo del SNE.

6.2.2.6 BBX

BBX es un factor de transcripción miembro de la familia SOX, el cual se expresa en el núcleo de las células progenitoras neurales del SNC en desarrollo [Dixon y cols., 2013; Chen y cols., 2014]. Un estudio en levaduras mostró que *Bbx* promovía la transición de G1/S, mostrando su papel en la progresión del ciclo celular [Sánchez-Díaz y cols. 2001]. La expresión de *Bbx* es reprimida por el factor de transcripción Nfix durante el desarrollo del SNC [Dixon y cols., 2013], se ha mostrado que dicho factor de transcripción reprime la expresión de genes específicos de progenitores neurales como *Sox9* y por tanto su función principal es promover la diferenciación de dichas células. La ausencia de Nfix aumenta la expresión de *Bbx* sugiriendo que este gen podría promover la autorenovación de células progenitoras durante el desarrollo del SNC [Heng y cols., 2013], aunque la función de *Bbx* es aún desconocida. En este estudio se ha detectado la expresión de *BBX*

en CPEs de humano y su sobreexpresión en pacientes HSCR. Es interesante resaltar que varios factores de transcripción de la familia SOX han sido implicados en procesos importantes del desarrollo del SNE, como la autorenovación de progenitores neurales (SOX9) [Scott y cols., 2010] y el desarrollo de la cresta neural (SOX2 y SOX8) [O'Donnell y cols., 2006; Mandalos y cols., 2014], así como en la aparición de HSCR (SOX10 y SOX2) [Bondurand y Sham, 2013]. Todas estas evidencias apoyan que BBX podría jugar un papel análogo en el desarrollo del SNE

6.2.2.7 DRG1

DRG1 (*Developmentally regulated GTP-binding protein 1*) es un miembro de la familia DRG perteneciente a la superfamilia de las GTPasas, a la cual pertenece también RAB10. Es importante mencionar que el gen *DRG1* humano mapea con la región cromosómica 22q12^q13.1 [Li y Trueb, 2000], la cual ha sido relacionada con HSCR [Pingault y cols., 1997]. Kumar y cols., denominaron a *Drg1* inicialmente como *Nedd3* (*NPC-Expressed, Developmentally Down-regulated*), ya que identificaron su expresión en células precursoras neurales de ratón, la cual desciende de manera gradual durante el desarrollo del SNC. Posteriormente se observó que su expresión en capas internas del cerebro, donde las células están proliferando e iniciando su diferenciación intensamente era más elevada que en otras zonas más diferenciadas, indicando un posible papel de *Drg1* en la proliferación y/o en los estadios más tempranos de la diferenciación neuronal. Por otro lado, su expresión también fue detectada en varias estructuras embrionarias, disminuyendo tras el nacimiento [Sazuka y cols., 1992].

Estudios en humanos han mostrado el papel de *DRG1* en la proliferación celular [Kiniwa y cols., 2015; Lu y cols., 2016]. Recientemente Lu y cols., determinaron el mecanismo molecular por el cual *DRG1* ejerce esta función en líneas celulares tumorales humanas ya que localizan a *DRG1* en el huso mitótico y detectan su interacción con proteínas involucradas en el control del ciclo celular. Su sobreexpresión causa una desregulación del punto de control mitótico y una segregación cromosómica anormal, dando lugar a un aumento de la proliferación [Lu y cols., 2016]. Teniendo en cuenta todos nuestros resultados y en base al papel descrito de *DRG1* en el ciclo celular, podría ser propuesto el papel proliferativo de *DRG1* en las CPEs durante el desarrollo del SNE. Por tanto, la sobreexpresión de *DRG1* podría contribuir a la aparición de HSCR al provocar una desregulación del control del ciclo celular de las CPEs, dando lugar a un crecimiento aberrante de estas células.

6.2.2.8 RNA45S5

RNA45S5 codifica un precursor de ARN ribosomal (ARNr) que da lugar a las subunidades 18S, 5.8S y 28S ribosómicas, esenciales para la estructura y función de los ribosomas (Figura 45). La transcripción de los genes de ARN ribosomales es llevada a cabo por la enzima ARN polimerasa I (Pol I), dándose lugar posteriormente varias etapas de procesamiento del ARNr para finalmente sintetizarse los ribosomas funcionales [Grozdanov y cols., 2003]. El gen *RNA45S5* se localiza en el genoma humano en los cromosomas 13, 14, 15, 21 y 22, teniendo cada cromosoma entre 30 y 40 copias del gen en tándem. La biogénesis de ribosomas está generalmente incrementada en la fase G1 del ciclo celular donde se requiere un aumento de síntesis de proteínas [Thomas, 2000]. Por tanto, la inhibición de la síntesis de ribosomas causa una parada del ciclo en G1, deteniendo la proliferación celular [Volarević y cols., 2000]. Una desregulación en la biogénesis de ribosomas se ha asociado a la etiología de una variedad de enfermedades humanas, como el caso del cáncer, donde un aumento de la síntesis ribosomal es observada en varios tipos de tumores. Por otro lado, las denominadas ribosomopatías son producidas principalmente por mutaciones que dan lugar a la pérdida de función en alguno de los componentes de la biogénesis de ribosomas [Hannan y cols., 2013; Diesch y cols., 2014; Wang y cols., 2015].

Existen evidencias que sugieren que genes relacionados con la biogénesis de ribosomas tienen un papel crucial en el desarrollo de las CCN y que mutaciones en los mismos resultan en la aparición de determinadas neurocristopatía, como es el caso del síndrome de Treacher Collins (TCS, OMIM#154500). TCS se caracteriza por un desarrollo craneofacial anormal debido a fallos en la supervivencia, migración y diferenciación de las CCN craneales durante la embriogénesis temprana, provocado por defectos en la biogénesis de los ribosomas [Dixon y cols., 2007]. Los pacientes con este síndrome portan mutaciones en una de las copias del gen *TCOF1*, el cual codifica para una proteína esencial para la transcripción de los genes ribosomales. Se ha mostrado que *Tcof1* es esencial para la formación y proliferación de las CCN en ratón, además se ha identificado que ratones haploinsuficientes para *Tcof1* muestran una menor producción ribosomal asociada a un descenso de la proliferación y un incremento de la apoptosis dependiente de P53, dando lugar a un menor número de CCN craneal durante el desarrollo provocando los defectos característicos de TCS [Hannan y cols., 2013; Diesch y cols., 2014; Wang y cols., 2015]. En resumen, la transcripción del gen *RNA45S5* es esencial para la correcta biogénesis de los ribosomas y desregulaciones a este nivel que promuevan un aumento de dicha biogénesis se ha relacionado con una mayor proliferación y/o aumento de la supervivencia celular, lo que ha sido mostrado en el desarrollo de la cresta neural [Thomas, 2000; Hannan y cols., 2013; Diesch y cols., 2014; Wang y

cols., 2015].

En el presente estudio se ha detectado a la región promotora del gen *Rn45s* como diana de DNMT3b, como se puede ver en la figura 42, dicha región está enriquecida en CpG. En este sentido se ha descrito que la inactivación transcripcional de ADN ribosomales (ADNr) tiene lugar mediante la metilación de las CpG del promotor de dichos ADNr [Diesch y cols., 2014]. Un estudio reciente en el que exponen a ratones a plomo desde el apareamiento hasta el estadio postnatal 21, ha identificado varias regiones genómicas diferencialmente metiladas en el hipocampo de ratón, siendo una de estas regiones el gen *Rn45s*. Además su nivel expresión correlacionó con su grado de metilación y por tanto evidencia la regulación de la expresión de *Rn45s* a través de la metilación en el SNC [Sánchez-Martín y cols., 2015]. Por otro lado, hemos correlacionado la subida de la expresión de *RNA45S5* con la bajada de expresión de *DNMT3b* en las CPEs de pacientes HSCR, por todo ello proponemos que DNMT3b estaría regulando la expresión de dicho gen en las CPEs. Además, la subida de expresión observada en *RNA45S5* podría estar promoviendo una mayor biogénesis ribosomal en estas células favoreciendo un aumento de su proliferación, este mecanismo propuesto podría contribuir el aumento del crecimiento de las CPEs observado tras la bajada de *Dnmt3b*.

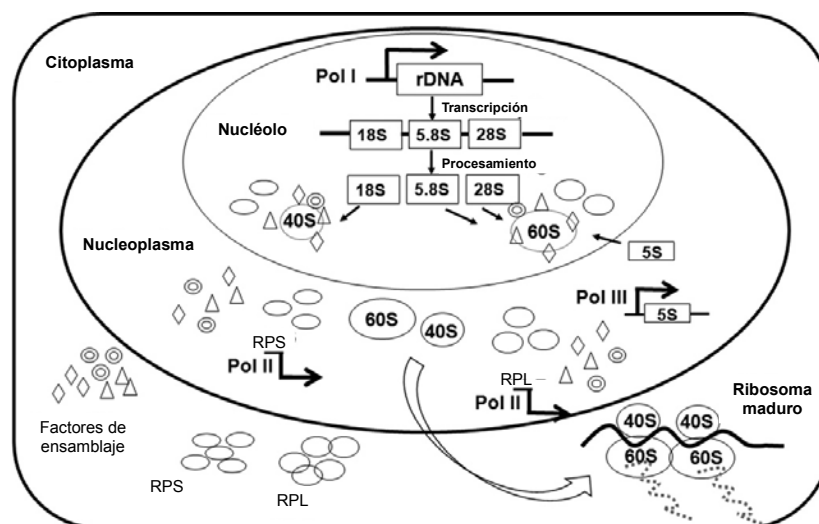


Figura 45. Biogénesis de los ribosomas. El diagrama muestra las diferentes etapas de dicho proceso. 1) Transcripción de los genes del ARN ribosomal a través de la actividad Pol I dando lugar a un único ARNr precursor dentro del nucleólo. 2) Maduración de los ARNr en las distintas subunidades 18S, 5.8S y 28S. La subunidad 5s se transcribe mediante la ARN polimerasa III (Pol III) y las proteínas ribosomales mediante ARN polimerasa II (Pol II) en el nucleoplasma. 3) Transporte al nucleólo de las proteínas ribosomales y el ARN 5S donde se ensamblan con los ARNr para formar las subunidades pequeña (40S) y la grande (60S). 4) Transporte de ambas subunidades al citoplasma donde forman el ribosoma maduro (80S). RPS (proteínas ribosomales de la subunidad pequeña), RPL (proteínas ribosomales de la subunidad grande) [Adaptada de Wang y cols., 2015].

6.2.2.9 RP11-220D10.1

RP11-220D10.1 o RPL36P14 (Ribosomal Protein L36 Pseudogene 14) es un pseudogén. Los pseudogenes se definen como una copia de un gen que ha perdido su capacidad de sintetizar una proteína, entre los diferentes tipos están los denominados pseudogenes procesados, que son copias resultantes de la retrotranscripción de ARNm a ADNc que se integran en una nueva localización genómica [D'Errico y cols., 2004] (Figura 46A). Debido a que se producen a partir del ARNm, no presentan secuencias intrónicas ni promotor, y por tanto sólo se transcriben si se integran cerca de un promotor preexistente [Zheng y cols. 2007]. Este tipo de pseudogenes son los más abundantes, siendo el tipo de genes que lo producen predominantemente genes *housekeeping* o pequeños ARNs como por ejemplo los genes codificantes de proteínas ribosomales [Zhang y cols., 2002]. En nuestro caso, RP11-220D10.1 o RPL36P14 es un pseudogén procesado del gen codificante de la proteína ribosomal RPL36, el cual tiene múltiples pseudogenes procesados dispersados por el genoma. RPL36, es requerido para el correcto ensamblaje de los ribosomas maduros y recientemente ha sido definido como gen supresor de tumores [Provost y cols., 2014]. Hasta hace poco los pseudogenes se han catalogado como “ADN basura”, pero se ha demostrado que algunos son transcritos a ARN pudiendo influir en la actividad de los genes que codifican las proteínas de los que proceden debido a la homología entre sus secuencias, incluso algunos de ellos son capaces de producir lncARNs y por tanto han adquirido un papel regulador en la expresión génica. Los mecanismos por los cuales estos pseudogenes regulan a sus genes ancestrales y por tanto su función, ocurre a través de una variedad de mecanismos que no se conocen con detalle aún. En este sentido, se han identificado principalmente 4 posibles mecanismos por los que los pseudogenes regulan la expresión génica, ejemplo de ello son los genes *Ppp4r1*, *HDAC*, *Rangap1* y *PTEN* (Figura 46B) [Pink y Carter, 2013].

RP11-220D10.1 o RPL36P14 ha sido identificado como diana de DNMT3b en CPEs. A pesar de la dificultad que entraña la detección de los niveles de expresión de los pseudogenes debido a su elevada homología con su gen ancestral, hemos detectado un aumento de los niveles de ARNm de RP11-220D10.1 en precursores procedentes de pacientes HSCR con respecto a controles, aunque no podemos descartar la posibilidad de que el ARNm detectado sea del gen RPL36. Sin embargo, el hecho de que este pseudogén sea diana de DNMT3b y que dicha *de novo* metiltransferasa esté disminuida en pacientes HSCR, sugiere que el aumento detectado de ARNm sea procedente del pseudogén RP11-220D10.1 y no del gen RPL36. Sin embargo, esto es necesario que sea confirmado por técnicas más sofisticada como el RNA-seq. Por otro lado, se ha identificado que el gen *SRPK2* presenta una elevada similitud (89,29%) con RP11-220D10, dicho gen induce la apoptosis neuronal

[Jang y cols., 2009] y promueve el crecimiento y migración de células de cáncer de colon [Wang y cols., 2016]. De cualquier modo, este estudio abre un nuevo campo sobre la importancia del posible papel de los pseudogenes durante el desarrollo del SNE y en HSCR.

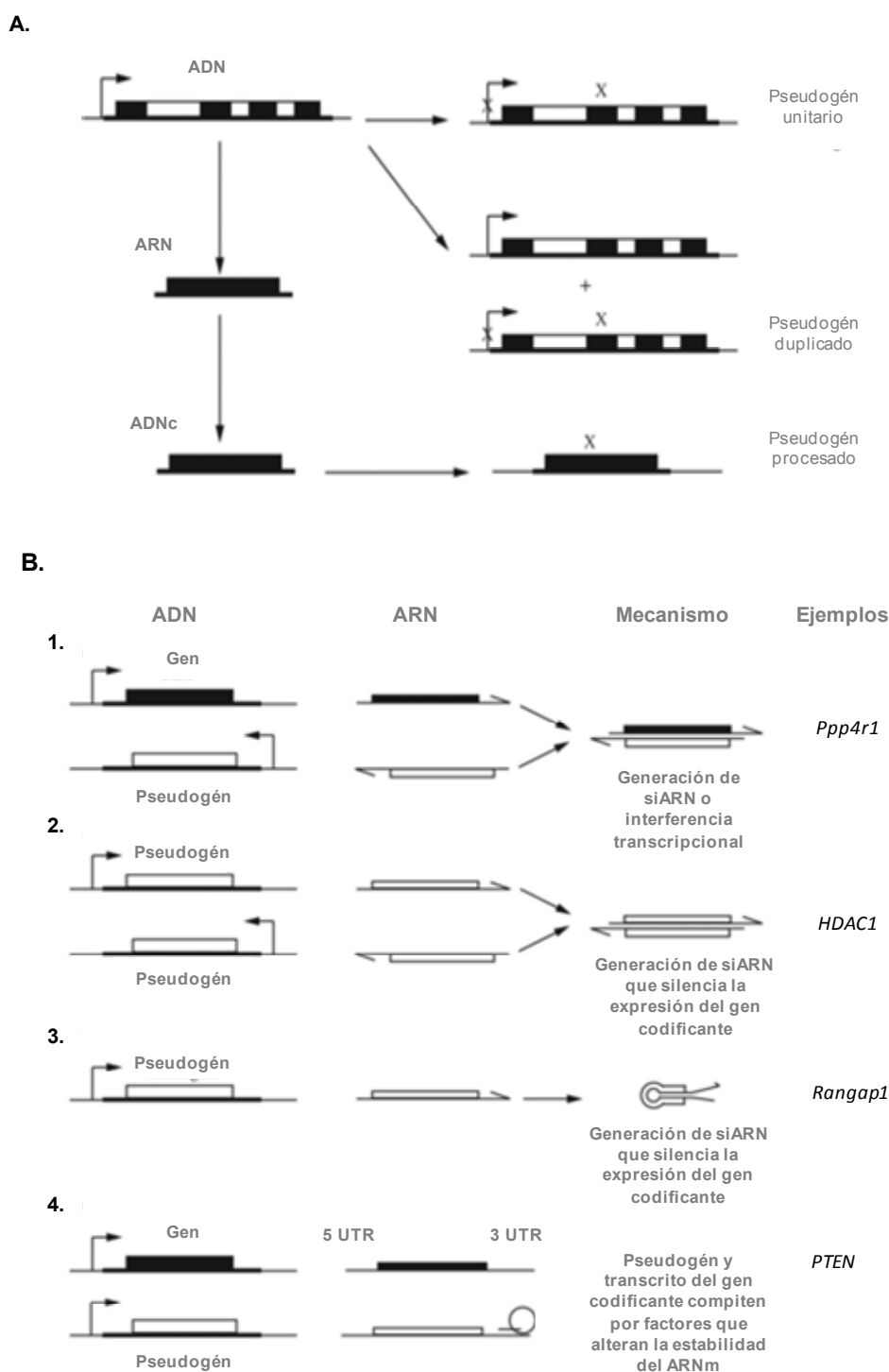


Figura 46A. Diferentes tipos de pseudogenes. El pseudogén unitario se forma por mutaciones espontáneas en el gen codificante. El pseudogén duplicado se forma cuando un gen se duplica, pero las mutaciones en la copia previenen la formación de una proteína. El pseudogén procesado surge cuando el gen se transcribe en ARN y luego se retrotranscribe a ADNc y finalmente se integra en el genoma. Los recuadros negros representan los exones y los recuadros blancos representan los intrones; X representa una mutación que impide que el gen codifique para una proteína. **46B. Mecanismos de regulación de la expresión génica mediado por los pseudogenes.** 1. El pseudogén genera un transcrito antisentido al que se transcribe del gen ancestral codificante, lo que permite la combinación de ambos transcritos por complementariedad formando un ARN de doble cadena, dicha molécula puede inhibir la traducción del ARN codificante o producir siARNs que conduce a la degradación del dicho ARN. 2. Estos siARNs también pueden surgir al emparejarse transcritos sentido y antisentido procedentes de pseudogenes. 3. Del mismo modo las moléculas siARNs originarse por la formación de estructuras secundarias del mismo transcrito de un pseudogén. 4. Los transcritos de pseudogenes pueden compartir con los transcritos del gen codificante los mismos sitios de unión a los miARNs o proteínas que regulan la estabilidad del ARNm, por tanto ocurre una competición por estos factores que da lugar a alteraciones de su regulación sobre los transcritos codificantes [Adaptada de Pink y Carter, 2013].

6.2.3 La identificación de variantes raras en los genes dianas de DNMT3b refuerza la posible implicación de los mismos en la aparición de HSCR

La búsqueda de variantes raras en las regiones codificantes de los genes expresados en las CPEs de humano, mostraron una serie de variantes con penetrancia incompleta en 5 de estos genes (*BBX*, *SULF1*, *RAB10*, *PPP2R2B*, *CDK5RAP2*) en los exomas de 56 de nuestros pacientes HSCR. Estas variantes podrían contribuir de una manera aditiva o multiplicativa al fenotipo HSCR.

En el gen *CDK5RAP2* se han identificado 4 variantes raras, donde dos ellas (*p.Lys828Glu* y *p.Asn469Ser*) estaban presentes en el mismo paciente con fenotipo S-HSCR. Otra de las variantes identificadas en *CDK5RAP2* (*p.Thr360Ile*) estaba presente junto con la variante *p.Asn720del* en *SULF1* en un paciente con fenotipo L-HSCR. En ambos pacientes, cada variante portada fue heredada de cada uno de los progenitores sanos, no presentándose la combinación de ambas variantes en ningún individuo sano, lo que estaría en concordancia con el modelo aditivo donde la presencia de variantes en distintos genes actúan de forma multiplicativa modulando la expresión de la enfermedad o la penetrancia de las mutaciones.

El resto de las variantes identificadas: *p.Ala260Val* en el gen *BBX*; *c.-340C>T* y *c.-369_-368delGA* en *RAB10*; *p.Pro24Thr* en *CDK5RAP2*; *p.Val370Ile*, *p.Asn302Ser* y *c.*231C>G* en *PPP2R2B*, todas ellas identificadas en pacientes HSCR esporádicos y heredadas de un progenitor sano. Debido a la base genética compleja que caracteriza a HSCR, no se puede descartar que estas

variantes identificadas estén presentes junto con otras variantes no conocidas aún y contribuyan de forma aditiva en la aparición de dicha enfermedad.

La variante *c.*231C>G* identificada en el gen *PPP2R2B*, se localiza en la región 3'UTR de dicho gen y es portada por un paciente con fenotipo L-HSCR. Dichas regiones 3'UTR han sido identificadas como sitios de unión de miARNs que van a tener un papel regulador de la expresión de génica a través de la represión traduccional, es decir, a nivel de proteína [Gu y Kay, 2010]. Mediante estudios *in silico*, se identificó que en la región donde se localiza la variante *c.*231C>G* hay una posible diana de unión de 3 miARNs (miR-4676-3p, miR-452-5p y miR-892c-3p). Por otro lado, se analizó el posible efecto de dicha variante sobre la unión de estos miARNs, identificándose que la variante *c.*231C>G* podría interrumpir la unión de los 3 miARNs, lo que llevaría a una alteración de los niveles de la proteína para la que codifica. El gen *PPP2R2B* codifica para la subunidad regulatoria B β de la proteína fosfatasa 2, y está asociada con una enfermedad neurodegenerativa, la ataxia espinocerebelar tipo 12 (SCA12) [Holmes y cols., 1999]. Este gen está ampliamente expresado en el cerebro embrionario de ratón, estando limitada su expresión a nivel neuronal [Schmidt y cols., 2002] donde participa en la apoptosis de este tipo celular [Dagda y cols., 2003; Dagda y cols., 2008; Merrill y cols., 2013]. También se ha mostrado que la expresión de *PPP2R2B* está regulada por su nivel de metilación en células tumorales [Tan y cols., 2010; Qian y cols., 2015; Majchrzak-Celińska y cols., 2016], lo que refuerza el hecho de que dicho gen es una posible diana de DNMT3b aunque su implicación en HSCR parece ocurrir mediante mecanismos regulatorios post-transcripcionales.

7. CONCLUSIONES

1. La bajada de la *de novo* metiltransferasa *Dnmt3b* inducida en las CPEs de ratón produce un aumento de la proliferación de dichas células. Por lo que podemos proponer un papel regulador de la proliferación de las CPEs durante el desarrollo del SNE para DNMT3b.
2. La bajada de expresión de *Dnmt3b* correlaciona con una bajada de expresión de *p53* y *p21* en las CPEs de ratón. Dicha correlación nos permite sugerir que el efecto observado en la proliferación de las CPEs mediado por DNMT3b sea a través de la actividad P53-P21.
3. La detección de la bajada de expresión de *P53* y *P21* en las CPEs de pacientes HSCR que presentaban una disminución en los niveles de DNMT3b, nos lleva a plantear que dicha *de novo* metiltransferasa regula la proliferación de las CPEs mediante la actividad de P53-P21 durante el desarrollo del SNE en humano.
4. El mecanismo propuesto para DNMT3b en la formación del SNE tiene un papel a nivel del control del ciclo celular, ya que la actividad conjunta de P53-P21 llevan a un arresto del mismo. Todo ello contribuye a la obtención de un número adecuado de CPEs que permita la correcta ganglionosis a lo largo del tracto gastrointestinal. Desregulaciones a este nivel, como la bajada de expresión de los genes anteriormente citados, provocaría un aumento en el número de dichas células alterando la homeostasis del proceso lo que contribuiría a la aparición de HSCR.
5. La detección de la bajada de expresión de *Dnmt3b/p53/p21* en las CPEs de ratón, así como en las de humano, muestra que el mecanismo propuesto para estos genes durante el desarrollo del SNE podría estar conservado entre especies.
6. El estudio de las regiones diana de DNMT3b en las CPEs de ratón mostró la unión preferencial de dicha proteína a regiones intergénicas e intrónicas y en el 1,5% de los casos a regiones promotoras.
7. La correlación observada entre la bajada de expresión de *Dnmt3b* y *p53* en las CPEs de ratón no corresponde a una interacción directa entre DNMT3b y *p53*, ya que este último no se identificó como diana de la *de novo* metiltransferasa tras analizar todas sus regiones diana en estas células.

8. Mediante el estudio de expresión en CPEs de humano se ha identificado que de los genes seleccionados en ratón para comprobar su posible implicación en HSCR, 14 genes (*CDK5RAP2*, *MYDGF*, *SULF1*, *EED*, *STAT3*, *DRG1*, *BBX*, *PPP2R2B*, *KPNA1*, *LITAF*, *RAB10*, *RNA45S5*, *CH507-528H12.1* y *CH507-513H4.4*) y 1 pseudogén (*RP11-220D10*) están expresados en los citados precursores, lo que sugiere su posible papel en el desarrollo del SNE.
9. Mediante el estudio de expresión diferencial entre CPEs de pacientes HSCR y controles se ha detectado un aumento de expresión de 9 genes (*KPNA1*, *SULF1*, *CDK5RAP2*, *BBX*, *DRG1*, *RAB10*, *MYDGF*, *RNA45S5* y *EED*) y 1 pseudogén (*RP11-220D10*), lo que permite proponerlos por primera vez como genes implicados en la etiopatogenia de HSCR.
10. El aumento de la expresión de las dianas de DNMT3b (*KPNA1*, *SULF1*, *CDK5RAP2*, *BBX*, *DRG1*, *RAB10*, *MYDGF*, *RNA45S5* y *RP11-220D10*) en pacientes HSCR correlaciona con la bajada de expresión de *DNMT3b* y el menor nivel de metilación global observado en esta enfermedad. En este sentido, hipotetizamos que alteraciones en los niveles de metilación regulados por DNMT3b darían lugar a un patrón de expresión aberrante en el que dichas dianas se encuentran sobreexpresadas, contribuyendo a la aparición de esta patología.
11. Se ha validado un método de análisis para la identificación de los genes dianas de dicha *de novo* metiltransferasa. Dicho análisis se basa en la combinación de dos procedimientos que permiten un filtrado de los datos masivos obtenidos, resultando en la identificación de un número factible y fiable de dianas de una proteína de interés.
12. El uso de la herramienta *in silico* Ingenuity Pathway analysis (IPA) ha permitido la selección del gen *EED*, miembro del complejo epigenético PRC2, para el análisis de su posible implicación en HSCR. El aumento de su expresión en pacientes HSCR ha permitido proponerlo como un gen implicado en la aparición de HSCR.
13. La detección de una serie de variantes raras en *CDK5RAP2* y *SULF1*, que siguen el modelo aditivo propuesto para los casos HSCR esporádicos, refuerza el posible papel de estos genes en la aparición de la enfermedad.

14. Se ha afianzado la importancia de DNMT3b en la aparición de HSCR mediante una aproximación experimental indirecta que nos ha permitido extrapolar los resultados obtenidos en CPEs de ratón al contexto de dicha enfermedad. Por tanto, la aplicación de la estrategia llevada a cabo en este estudio puede ser de utilidad para el esclarecimiento de la etiopatogenia de otras enfermedades raras con base genética compleja.
15. Finalmente este trabajo reafirma el interés de ampliar el paradigma establecido para HSCR con el análisis desde un punto de vista epigenético, lo que llevaría a un conocimiento de la etiopatogenia de dicha enfermedad más completo.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Afgar A, Fard-Esfahani P, Mehrtash A, Azadmanesh K, Khodarahmi F, Ghadir M, Teimoori-Toolabi L. MiR-339 and especially miR-766 reactivate the expression of tumor suppressor genes in colorectal cancer cell lines through DNA methyltransferase 3B gene inhibition. *Cancer Biol. Ther.* 17: 1126-1138, 2016.
- Ai X, Do AT, Kusche-Gullberg M, Lindahl U, Lu K, Emerson CP Jr. Substrate specificity and domain functions of extracellular heparan sulfate 6-O-endosulfatases, QSulf1 and QSulf2. *J. Biol. Chem.* 281: 4969-4976, 2006.
- Ai X, Kitazawa T, Do AT, Kusche-Gullberg M, Labosky PA, Emerson CP Jr. SULF1 and SULF2 regulate heparan sulfate-mediated GDNF signaling for esophageal innervation. *Development* 134: 3327-3338, 2007.
- Airaksinen MS, Titievsky A, Saarma M. GDNF family neurotrophic factor signaling: four masters, one servant?. *Mol. Cell Neurosci.* 13: 313-325, 1999.
- Al Oustah A, Danesin C, Khouri-Farah N, Farreny MA, Escalas N, Cochard P, Glise B, Soula C. Dynamics of sonic hedgehog signaling in the ventral spinal cord are controlled by intrinsic changes in source cells requiring sulfatase 1. *Development* 141: 1392-1403, 2014.
- Almond S, Lindley RM, Kenny SE, Connell MG, Edgar DH. Characterisation and transplantation of enteric nervous system progenitor cells. *Gut* 56: 489-496, 2007.
- Al Zaid Siddiquee K, Turkson J. STAT3 as a target for inducing apoptosis in solid and hematological tumors. *Cell Res.* 18: 254-267, 2008.
- Amiel J, Lyonnet S. Hirschsprung disease, associated syndromes, and genetics: a review. *J. Med. Genet.* 38: 729-739, 2001.
- Amiel J, Sproat-Emission E, Garcia-Barcelo M, Lantieri F, Burzynski G, Borrego S, Pelet A, Arnold S, Miao X, Griseri P, Brooks AS, Antinolo G, de Pontual L, Clement-Ziza M, Munnich A, Kashuk C, West K, Wong KK, Lyonnet S, Chakravarti A, Tam PK, Ceccherini I, Hofstra RM, Fernandez R; Hirschsprung Disease Consortium. Hirschsprung disease, associated syndromes and genetics: a review. *J. Med. Genet.* 45: 1-14, 2008.
- Angrisano T, Sacchetti S, Natale F, Cerrato A, Pero R, Keller S, Peluso S, Perillo B, Avvedimento VE, Fusco A, Bruni CB, Lembo F, Santoro M, Chiariotti L. Chromatin and DNA methylation dynamics during retinoic acid-induced RET gene transcriptional activation in neuroblastoma cells. *Nucleic Acids Res.* 39: 1993-2006, 2011.
- Angrist M, Bolk S, Halushka M, Lapchak PA, Chakravarti A. Germline mutations in glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and RET in a Hirschsprung disease patient. *Nature Genet.* 14: 341-344, 1996.
- Arnold S, Pelet A, Amiel J, Borrego S, Hofstra R, Tam P, Ceccherini I, Lyonnet S, Sherman S, Chakravarti A. Interaction Between a Chromosome 10 RET Enhancer and Chromosome 21 in the Down Syndrome-Hirschsprung Disease Association. *Hum. Mutat.* 30: 771-775, 2009.
- Baloh RH, Tansey MG, Lampe PA, Fahrner TJ, Enomoto H, Simburger KS, Leitner ML, Araki T, Johnson EM Jr, Milbrandt J. Artemin, a novel member of the GDNF ligand family, supports peripheral and central neurons and signals through the GFRalpha3-RET receptor complex. *Neuron* 21: 1291-1302, 1998.
- Bao H, Chen H, Zhu X, Zhang M, Yao G, Yu Y, Qin W, Zeng C, Zen K, Liu Z. MiR-223 downregulation promotes glomerular endothelial cell activation by upregulating importin $\alpha 4$ and $\alpha 5$ in IgA nephropathy. *Kidney Int.* 85: 624-635, 2014.
- Beaulieu N, Morin S, Chute IC, Robert MF, Nguyen H, MacLeod AR. An essential role for DNA

- methytransferase DNMT3B in cancer cell survival. *J. Biol. Chem.* 277: 28176-28181, 2002.
- Bernstein BE, Meissner A, Lander ES. The mammalian epigenome. *Cell* 128: 669-681, 2007.
- Bible PW, Kanno Y, Wei L, Brooks SR, O'Shea JJ, Morasso MI, Loganantharaj R, Sun HW. PAPST, a User Friendly and Powerful Java Platform for ChIP-Seq Peak Co-Localization Analysis and Beyond. *PLoS One* 10: e0127285, 2015.
- Biegging KT, Mello SS, Attardi LD. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat. Rev. Cancer* 14: 359-370, 2014.
- Binder BJ, Landman KA, Simpson MJ, Mariani M, Newgreen DF. Modeling proliferative tissue growth: a general approach and an avian case study. *Phys. Rev. E. Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* 78: 031912, 2008.
- Blattler A, Yao L, Witt H, Guo Y, Nicolet CM, Berman BP, Farnham PJ. Global loss of DNA methylation uncovers intronic enhancers in genes showing expression changes. *Genome Biol.* 15: 469, 2014.
- Boguski MS, McCormick F. Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* 366: 643-654, 1993.
- Bond J, Roberts E, Springell K, Lizarraga SB, Scott S, Higgins J, Hampshire DJ, Morrison EE, Leal GF, Silva EO, Costa SM, Baralle D, Raponi M, Karbani G, Rashid Y, Jafri H, Bennett C, Corry P, Walsh CA, Woods CG. A centrosomal mechanism involving CDK5RAP2 and CENPJ controls brain size. *Nat. Genet.* 37: 353-355, 2005.
- Bondurand N, Dastot-Le Moal F, Stanchina L, Collot N, Baral V, Marlin S, Attie-Bitach T, Giurgea I, Skopinski L, Reardon W, Toutain A, Sarda P, Echaieb A, Lackmy-Port-Lis M, Touraine R, Amiel J, Goossens M, Pingault V. Deletions at the SOX10 gene locus cause Waardenburg syndrome types 2 and 4. *Am. J. Hum. Genet.* 81: 1169-1185, 2007.
- Bondurand N, Natarajan D, Barlow A, Thapar N, Pachnis V. Maintenance of mammalian enteric nervous system progenitors by SOX10 and endothelin 3 signalling. *Development* 133: 2075-2086, 2006.
- Bondurand N, Natarajan D, Thapar N, Atkins C, Pachnis V. Neuron and glia generating progenitors of the mammalian enteric nervous system isolated from foetal and postnatal gut cultures. *Development* 130: 6387-6400, 2003.
- Bondurand N, Sham MH. The role of SOX10 during enteric nervous system development. *Dev. Biol.* 382: 330-343, 2013.
- Borgel J, Guibert S, Li Y, Chiba H, Schübeler D, Sasaki H, Forné T, Weber M. Targets and dynamics of promoter DNA methylation during early mouse development. *Nat. Genet.* 42: 1093-1100, 2010.
- Borrego S, Fernández RM, Dziema H, Niess A, López-Alonso M, Antiñolo G, Eng C. Investigation of germline GFRA4 mutations and evaluation of the involvement of GFRA1, GFRA2, GFRA3, and GFRA4 sequence variants in Hirschsprung disease. *J. Med. Genet.* 40: e18, 2003.
- Borrego S, Ruiz-Ferrer M, Fernández RM, Antiñolo G. Hirschsprung's disease as a model of complex genetic etiology. *Histol. Histopathol.* 28: 1117-1136, 2013.
- Buchman JJ, Tseng HC, Zhou Y, Frank CL, Xie Z, Tsai LH. Cdk5rap2 interacts with pericentrin to maintain the neural progenitor pool in the developing neocortex. *Neuron* 66: 386-402, 2010.
- Burns AJ, Thapar N. Neural stem cell therapies for enteric nervous system disorders. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 11: 317-328, 2014.

- Butler Tjaden NE, Trainor PA. The developmental etiology and pathogenesis of Hirschsprung disease. *Transl. Res.* 162: 1-15, 2013.
- Cacalano G, Fariñas I, Wang LC, Hagler K, Forgie A, Moore M, Armanini M, Phillips H, Ryan AM, Reichardt LF, Hynes M, Davies A, Rosenthal A. GFR α 1 is an essential receptor component for GDNF in the developing nervous system and kidney. *Neuron* 21: 53-62, 1998.
- Cao C, Zhang H, Zhao L, Zhou L, Zhang M, Xu H, Han X, Li G, Yang X, Jiang Y. miR-125b targets DNMT3b and mediates p53 DNA methylation involving in the vascular smooth muscle cells proliferation induced by homocysteine. *Exp. Cell Res.* 347: 95-104, 2016.
- Chan KK, Wong CK, Lui VC, Tam PK, Sham MH. Analysis of SOX10 mutations identified in Waardenburg-Hirschsprung patients: Differential effects on target gene regulation. *J. Cell. Biochem.* 90: 573-585, 2003.
- Chakravarti A, Lyonnet S. Hirschsprung disease. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited disease. Capítulo 251. Eds McGraw-Hill Companies, 2001.
- Chen T, Zhou L, Yuan Y, Fang Y, Guo Y, Huang H, Zhou Q, Lv X. Characterization of Bbx, a member of a novel subfamily of the HMG-box superfamily together with Cic. *Dev. Genes Evol.* 224: 261-268, 2014.
- Cheng X, Blumenthal RM. Mammalian DNA methyltransferases: a structural perspective. *Structure* 16: 341-350, 2008.
- Choo HJ, Cutler A, Pavlath GK. Karyopherin Alpha 1 Regulates Satellite Cell Proliferation and Survival by Modulating Nuclear Import. *Stem Cells* 34: 2784-2797, 2016.
- Cooper JE, McCann CJ, Natarajan D, Choudhury S, Boesmans W, Delalande JM, Vanden Berghe P, Burns AJ, Thapar N. In Vivo Transplantation of Enteric Neural Crest Cells into Mouse Gut; Engraftment, Functional Integration and Long-Term Safety. *PLoS One* 11: e0147989, 2016.
- Curradi M, Izzo A, Badaracco G, Landsberger N. Molecular mechanisms of gene silencing mediated by DNA methylation. *Mol. Cell Biol.* 22: 3157-3173, 2002.
- Dagda RK, Merrill RA, Cribbs JT, Chen Y, Hell JW, Usachev YM, Strack S. The spinocerebellar ataxia 12 gene product and protein phosphatase 2A regulatory subunit Bbeta2 antagonizes neuronal survival by promoting mitochondrial fission. *J. Biol. Chem.* 283: 36241-36248, 2008.
- Dagda RK, Zaucha JA, Wadzinski BE, Strack S. A developmentally regulated, neuron-specific splice variant of the variable subunit B-beta targets protein phosphatase 2A to mitochondria and modulates apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278: 24976-24985, 2003.
- D'Errico I, Gadaleta G, Saccone C. Pseudogenes in metazoa: origin and features. *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.* 3: 157-167, 2004.
- de Pontual L, Trochet D, Bourdeaut F, Thomas S, Etchevers H, Chompret A, Minard V, Valteau D, Brugieres L, Munnich A, Delattre O, Lyonnet S, Janoueix-Lerosey I, Amiel J. Methylation-associated PHOX2B gene silencing is a rare event in human neuroblastoma. *Eur. J. Cancer* 43: 2366-2372, 2007.
- Deen AJ, Rilla K, Oikari S, Kärnä R, Bart G, Häyrynen J, Bathina AR, Ropponen A, Makkonen K, Tammi RH, Tammi MI. Rab10-mediated endocytosis of the hyaluronan synthase HAS3 regulates hyaluronan synthesis and cell adhesion to collagen. *J. Biol. Chem.* 289: 8375-8389, 2014.
- den Dunnen JT, Antonarakis SE. Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum. Genet.* 109: 121-124, 2001.

- Deng CY, Lei WL, Xu XH, Ju XC, Liu Y, Luo ZG. JIP1 mediates anterograde transport of Rab10 cargos during neuronal polarization. *J. Neurosci.* 34: 1710-1723, 2014.
- Dettmann HM, Zhang Y, Wronna N, Kraushaar U, Guenther E, Mohr R, Neckel PH, Mack A, Fuchs J, Just L, Obermayr F. Isolation, expansion and transplantation of postnatal murine progenitor cells of the enteric nervous system. *PLoS One* 9: e97792, 2014.
- Di Croce L, Helin K. Transcriptional regulation by Polycomb group proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20: 1147-1155, 2013.
- Diesch J, Hannan RD, Sanij E. Perturbations at the ribosomal genes loci are at the centre of cellular dysfunction and human disease. *Cell Biosci.* 4: 43, 0214.
- Dixon C, Harvey TJ, Smith AG, Gronostajski RM, Bailey TL, Piper M. Nuclear factor one X regulates Bobby sox during development of the mouse forebrain. *Cell. Mol. Neurobiol.* 33: 867-873, 2013.
- Dixon J, Trainor P, Dixon MJ. Treacher Collins syndrome. *Orthod. Craniofac. Res.* 10: 88-95, 2007.
- Dopazo J, Amadoz A, Bleda M, Garcia-Alonso L, Alemán A, García-García F, Rodriguez JA, Daub JT, Muntané G, Rueda A, Vela-Boza A, López-Domingo FJ, Florido JP, Arce P, Ruiz-Ferrer M, Méndez-Vidal C, Arnold TE, Spleiss O, Alvarez-Tejado M, Navarro A, Bhattacharya SS, Borrego S, Santoyo-López J, Antiñolo G. 267 Spanish Exomes Reveal Population-Specific Differences in Disease-Related Genetic Variation. *Mol. Biol. Evol.* 33: 1205-1218, 2016.
- Draht MX, Smits KM, Jooste V, Tournier B, Vervoort M, Ramaekers C, Cha-pusot C, Weijenberg MP, van Engeland M, Melotte V. Analysis of RET promoter CpG island methylation using methylation-specific PCR (MSP), pyrosequencing, and methylation-sensitive high-resolution melting (MS-HRM): impact on stage II colon cancer patient outcome. *Clin. Epigenet.* 8: 44, 2016.
- Dwivedi RC, Krokhin OV, El-Gabalawy HS, Wilkins JA. Development of an SRM method for absolute quantitation of MYDGF/C19orf10 protein. *Proteomics Clin. Appl.* 10: 663-670, 2016.
- Ehrlich M, Sanchez C, Shao C, Nishiyama R, Kehrl J, Kuick R, Kubota T, Hanash SM. CF an immunodeficiency syndrome: DNAmethyltransferase 3B involvement, chromosome anomalies, and gene dysregulation. *Autoimmunity* 41: 253-271, 2008.
- Eketjäll S, Ibáñez CF. Functional characterization of mutations in the GDNF gene of patients with Hirschsprung disease. *Hum. Mol. Gen.* 11: 325-329, 2002.
- Emison ES, Garcia-Barcelo M, Grice EA, Lantieri F, Amiel J, Burzynski G, Fernandez RM, Hao L, Kashuk C, West K, Miao X, Tam PK, Griseri P, Ceccherini I, Pelet A, Jannot AS, de Pontual L, Henrion-Caude A, Lyonnet S, Verheij JB, Hofstra RM, Antiñolo G, Borrego S, McCallion AS, Chakravarti A. Differential contributions of rare and common, coding and noncoding Ret mutations to multifactorial Hirschsprung disease liability. *Am. J. Hum. Genet.* 87: 60-74, 2010.
- Emison ES, McCallion AS, Kashuk CS, Bush RT, Grice E, Lin S, Portnoy ME, Cutler DJ, Green ED, Chakravarti A. A common sex dependent mutation in a RET enhancer underlies Hirschsprung disease risk. *Nature* 434: 857-863, 2005.
- Enguix-Riego MV, Torroglosa A, Fernández RM, Moya-Jiménez MJ, de Agustín JC, Antiñolo G, Borrego S. Identification of different mechanisms leading to PAX6 down regulation, as potential events contributing to the onset of Hirschsprung disease. *Sci. Rep.* 6: 21160, 2016.
- Faheem M, Naseer MI, Rasool M, Chaudhary AG, Kumosani TA, Ilyas AM, Pushparaj P, Ahmed F, Algahtani HA, Al-Qahtani MH, Saleh Jamal H. Molecular genetics of human primary microcephaly: an overview. *BMC Med. Genomics* 8(S1), 2015.

- Foust KB, Li Y, Park K, Wang X, Liu S, Cabot RA. The polycomb group protein EED varies in its ability to access the nucleus in porcine oocytes and cleavage stage embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 133: 198-204, 2012.
- Franke A, Fischer A, Nothnagel M, Becker C, Grabe N, Till A, Lu T, Müller-Quernheim J, Wittig M, Hermann A, Balschun T, Hofmann S, Niemiec R, Schulz S, Hampe J, Nikolaus S, Nürnberg P, Krawczak M, Schürmann M, Rosenstiel P, Nebel A, Schreiber S. Genome-wide association analysis in sarcoidosis and Crohn's disease unravels a common susceptibility locus on 10p12.2. *Gastroenterology* 135: 1207-1215, 2008.
- Fu M, Lui VCH, Sham MH, Pachnis V, Tam PKH. Sonic hedgehog regulates the proliferation, differentiation, and migration of enteric neural crest cells in gut. *J. Cell Biol.* 166: 673-684, 2004.
- Furness JB. *The Enteric Nervous System*. Primera edición. Blackwell Pub, 2006.
- Furness JB. The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 9: 286-294, 2012.
- Furthauer M, González-Gaitán M. Tales of 1001 functions: the multiple roles of membrane trafficking in development. *Traffic* 10: 781-782, 2009.
- Gabriel SB, Salomon R, Pelet A, Angrist M, Amiel J, Fornage M, Attié-Bitach T, Olson JM, Hofstra R, Buys C, Steffann J, Munnich A, Lyonnet S, Chakravarti A. Segregation at three loci explains familial and population risk in Hirschsprung disease. *Nat. Genet.* 31: 89-93, 2002.
- Gao H, Zhang ZB, Jiang ZJ, Wang DJ, Huang Y, Wang WL. [Mutation and expression of WNT8b gene and SHH gene in Hirschsprung disease]. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi* 13: 758-761, 2010.
- Gasque Schoof CR, Izzotti A, Jasiulionis MG, Vasques Ldos R. The Roles of miR-26, miR-29, and miR-203 in the Silencing of the Epigenetic Machinery during Melanocyte Transformation. *Biomed. Res. Int.* 2015: 634749, 2015.
- Gräff J, Kim D, Dobbin MM, Tsai LH. Epigenetic regulation of gene expression in physiological and pathological brain processes. *Physiol. Rev.* 91: 603-649, 2010.
- Green SA, Simoes-Costa M, Bronner ME. Evolution of vertebrates as viewed from the crest. *Nature* 520: 474-482, 2015.
- Grozdanov P, Georgiev O, Karagyozev L. Complete sequence of the 45-kb mouse ribosomal DNA repeat: analysis of the intergenic spacer. *Genomics* 82: 637-643, 2003.
- Gu S, Kay M. How do miARNs mediate translational repression?. *Silence* 1: 11, 2010.
- Guiral EC, Faas L, Pownall ME. Neural crest migration requires the activity of the extracellular sulphatases XtSulf1 and XtSulf2. *Dev. Biol.* 341: 375-388, 2010.
- Hagemann S, Kuck D, Stresemann C, Prinz F, Brueckner B, Mund C, Mumberg D, Sommer A. Antiproliferative effects of DNA methyltransferase 3B depletion are not associated with DNA demethylation. *PLoS One* 7: e36125, 2012.
- Hannan KM, Sanij E, Rothblum LI, Hannan RD, Pearson RB. Dysregulation of RNA polymerase I transcription during disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1829: 342-360, 2013.
- Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y. Apoptosis - the p53 network. *J. Cell Sci.* 116: 4077-4085, 2003.
- Heanue TA, Pachnis V. Enteric nervous system development and Hirschsprung's disease: advances in genetic and stem cell studies. *Nat. Rev. Neurosci.* 8: 466-479, 2007.

- Heng YH, McLeay RC, Harvey TJ, Smith AG, Barry G, Cato K, Plachez C, Little E, Mason S, Dixon C, Gronostajski RM, Bailey TL, Richards LJ, Piper M. NFIX regulates neural progenitor cell differentiation during hippocampal morphogenesis. *Cereb. Cortex* 24: 261-79, 2014.
- Henion PD, Weston JA. Timing and pattern of cell fate restrictions in the neural crest lineage. *Development* 124: 4351-4359, 1997.
- Hetz S, Acikgoez A, Voss U, Nieber K, Holland H, Hegewald C, Till H, Metzger R, Metzger M. In vivo transplantation of neurosphere- like bodies derived from the human postnatal and adult enteric nervous system: a pilot study. *PLoS One* 9: e93605, 2014
- Heuckeroth RO, Enomoto H, Grider JR, Golden JP, Hanke JA, Jackman A, Molliver DC, Bardgett ME, Snider WD, Johnson EM Jr, Milbrandt J. Gene targeting reveals a critical role for neurturin in the development and maintenance of enteric, sensory, and parasympathetic neurons. *Neuron* 22: 253-263, 1999.
- Heuckeroth RO, Lampe PA, Johnson EM, Milbrandt J. Neurturin and GDNF promote proliferation and survival of enteric neuron and glial progenitors in vitro. *Dev. Biol.* 200: 116-129, 1998.
- Heuckeroth RO, Schäfer KH. Gene-environment interactions and the enteric nervous system: Neural plasticity and Hirschsprung disease prevention. *Dev. Biol.* 417: 188-197, 2016.
- Hofstra R, Wu Y, Stulp RP, Elfferich P, Osinga J, Maas SM, Siderius L, Brooks AS, vd Ende JJ, Heydendaal VM, Severijnen RS, Bax KM, Meijers C, Buys CH. RET and GDNF gene scanning in Hirschsprung patients using two dual denaturing gel systems. *Hum. Mutat.* 15: 418-429, 2000.
- Holmes SE, O'Hearn EE, McInnis MG, Gorelick-Feldman DA, Kleiderlein JJ, Callahan C, Kwak NG, Ingersoll-Ashworth RG, Sherr M, Sumner AJ, Sharp AH, Ananth U, Seltzer WK, Boss MA, Viera-Saecker AM, Epplen JT, Riess O, Ross CA, Margolis RL. Expansion of a novel CAG trinucleotide repeat in the 5' region of PPP2R2B is associated with SCA12. *Nat. Genet.* 23: 391-392, 1999.
- Hotta R, Stamp LA, Foong JP, McConnell SN, Bergner AJ, Anderson RB, Enomoto H, Newgreen DF, Obermayr F, Furness JB, Young HM. Transplanted progenitors generate functional enteric neurons in the postnatal colon. *J. Clin. Invest.* 123: 1182-1191, 2013.
- Hu N, Strobl-Mazzulla PH, Bronner ME. Epigenetic regulation in neural crest development. *Dev. Biol.* 396: 159-168, 2014a.
- Hu N, Strobl-Mazzulla PH, Sauka-Spengler T, Bronner ME. DNA methyltransferase3A as a molecular switch mediating the neural tube-to-neural crest fate transition. *Genes Dev.* 26: 2380-2385, 2012.
- Hu N, Strobl-Mazzulla PH, Simoes-Costa M, Sánchez-Vásquez E, Bronner ME. DNA methyltransferase 3B regulates duration of neural crest production via repression of Sox10. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111: 17911-17916, 2014b.
- Huang W, Loganantharaj R, Schroeder B, Fargo D, Li L. PAVIS:a tool for Peak Annotation and Visualization. *Bioinformatics* 29: 3097-3099, 2013.
- Issa L, Kraemer N, Rickert CH, Siffringer M, Ninnemann O, Stoltenburg-Diding G, Kaundl AM. CDK5RAP2 expression during murine and human brain development correlates with pathology in primary autosomal recessive microcephaly. *Cereb. Cortex* 23: 2245-2260, 2013.
- Jang SW, Liu X, Fu H, Rees H, Yepes M, Levey A, Ye K. Interaction of Akt-phosphorylated SRPK2 with 14-3-3 mediates cell cycle and cell death in neurons. *J. Biol. Chem.* 284: 24512-24525, 2009.
- Jin B, Tao Q, Peng J, Soo HM, Wu W, Ying J, Fields CR, Delmas AL, Liu X, Qiu J, Robertson KD. DNAmethyltransferase3B (DNMT3B) mutations in ICF syndrome lead to altered epigenetic modifications and aberrant expression of genes regulating development, neurogenesis and immune

- function. *Hum. Mol. Genet.* 17: 690–709, 2008.
- Jing S, Wen D, Yu Y, Holst PL, Luo Y, Fang M, Tamir R, Antonio L, Hu Z, Cupples R, Louis JC, Hu S, Altrock BW, Fox GM. GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF. *Cell* 85: 1113-1124, 1996.
- Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat. Rev. Genet.* 13: 484-492, 2012.
- Jones PA, Taylor SM, Wilson V. DNA modification, differentiation, and transformation. *J. Exp. Zool.* 228: 287-295, 1983.
- Jurkowska RZ, Jurkowski TP, Jeltsch A. Structure and function of mammalian DNA methyltransferases. *Chembiochem.* 12: 206-222, 2011.
- Kaikkonen MU, Lam MT, Glass CK. Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics. *Cardiovasc Res* 90: 430-440, 2011.
- Kapur RP. Early death of neural crest cells is responsible for total enteric aganglionosis in Sox10Dom/Sox10Dom mouse embryos. *Pediatr. Dev. Pathol.* 2: 559-569, 1999.
- Kapur RP. Colonization of the murine hindgut by sacral crest-derived neural precursors: experimental support for an evolutionarily conserved model. *Dev. Biol.* 227: 146-155, 2000.
- Kapur RP. Practical pathology and genetics of Hirschsprung's disease. *Semin. Pediatr. Surg.* 18: 212-223, 2009.
- Kassis ES, Zhao M, Hong JA, Chen GA, Nguyen DM, Schrupp DS. Depletion of DNA methyltransferase 1 and/or DNA methyltransferase 3b mediates growth arrest and apoptosis in lung and esophageal cancer and malignant pleural mesothelioma cells. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 131: 298-306, 2006.
- Kashuk CS, Stone EA, Grice EA, Portnoy ME, Green ED, Sidow A, Chakravarti A, McCallion AS. Phenotype genotype correlation in Hirschsprung disease is illuminated by comparative analysis of the RET protein sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 8949-8954, 2005.
- Kim BH, Yi EH, Ye SK. Signal transducer and activator of transcription 3 as a therapeutic target for cancer and the tumor microenvironment. *Arch. Pharm. Res.* 39: 1085-1099, 2016.
- Kim J, Lo L, Dormand E, Anderson DJ. SOX10 maintains multipotency and inhibits neuronal differentiation of neural crest stem cells. *Neuron* 38: 17-31, 2003.
- Kim H, Ekram MB, Bakshi A, Kim J. AEBP2 as a transcriptional activator and its role in cell migration. *Genomics* 105: 108-115, 2015.
- Kim H, Kang K, Ekram MB, Roh TY, Kim J. Aebp2 as an epigenetic regulator for neural crest cells. *PLoSOne* 6: e25174, 2011.
- Kim H, Kang K, Kim J. AEBP2 as a potential targeting protein for Polycomb Repression Complex PRC2. *Nucleic. Acids. Res.* 37: 2940-2950, 2009.
- Kiniwa Y, Li J, Wang M, Sun C, Lee JE, Wang RF, Wang HY. Identification of DRG-1 As a Melanoma-Associated Antigen Recognized by CD4+ Th1 Cells. *PLoS One* 10: e0124094, 2015.
- Kippin TE, Martens DJ, van der Kooy D. p21 loss compromises the relative quiescence of forebrain stem cell proliferation leading to exhaustion of their proliferation capacity. *Genes Dev.* 19: 756-767, 2005.
- Köhler M, Speck C, Christiansen M, Bischoff FR, Prehn S, Haller H, Görlich D, Hartmann E. Evidence for

- distinct substrate specificities of importin alpha family members in nuclear protein import. *Mol. Cell. Biol.* 19: 7782-7791, 1999.
- Kojima K, Konopleva M, Samudio IJ, Shikami M, Cabreira-Hansen M, McQueen T, Ruvolo V, Tsao T, Zeng Z, Vassilev LT, Andreeff M. MDM2 antagonists induce p53-dependent apoptosis in AML: implications for leukemia therapy. *Blood* 106: 3150-3159, 2005.
- Konnikova L, Kotecki M, Kruger MM, Cochran BH. Knockdown of STAT3 expression by RNAi induces apoptosis in astrocytoma cells. *BMC Cancer* 3: 23, 2003.
- Korf-Klingebiel M, Reboll MR, Klede S, Brod T, Pich A, Polten F, Napp LC, Bauersachs J, Ganzer A, Brinkmann E, Reimann I, Kempf T, Niessen HW, Mizrahi J, Schönfeld HJ, Iglesias A, Bobadilla M, Wang Y, Wollert KC. Myeloid-derived growth factor (C19orf10) mediates cardiac repair following myocardial infarction. *Nat. Med.* 21: 140-149, 2015.
- Kumar S, Tomooka Y, Noda M. Identification of a set of genes with developmentally down-regulated expression in the mouse brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185: 1155-1161, 1992.
- Lake JJ, Heuckeroth RO. Enteric nervous system development: migration, differentiation, and disease. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 305: G1-24, 2013.
- Lambeth LS, Smith CA. Short hairpin RNA-mediated gene silencing. *Methods Mol. Biol.* 942: 205-232, 2013.
- Lane PW, Liu HM. Association of megacolon with a new dominant spotting gene (Dom) in the mouse. *J. Hered.* 75: 435-439, 1984.
- Lang D, Epstein JA. Sox10 and Pax3 physically interact to mediate activation of a conserved c-RET enhancer. *Hum. Mol. Genet.* 12: 937-945, 2003.
- Langer EM, Feng Y, Zhaoyuan H, Rauscher FJ 3rd, Kroll KL, Longmore GD. Ajuba LIM proteins are snail/slug corepressors required for neural crest development in *Xenopus*. *Dev. Cell* 14: 424-436, 2008.
- Langer JC. Persistent obstructive symptoms after surgery for Hirschsprung's disease: Development of a diagnostic and therapeutic algorithm. *J. Pediatr. Surg.* 39: 1458-1462, 2004.
- Lanzuolo C, Orlando V. Memories from the Polycomb group proteins. *Annu. Rev. Genet.* 46: 561-589, 2012.
- Law JA, Jacobsen SE. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat. Rev. Genet.* 11: 204-220, 2010.
- Le Douarin NM, Cameron-Curry P, Dulac C. Cellular interactions during the ontogeny of neural crest derivatives. *C. R. Acad. Sci. III* 314: 55-58, 1992.
- Lei H, Tang J, Li H, Zhang H, Lu C, Chen H, Wei L, Xia Y, Tang W. MiR-195 affects cell migration and cell proliferation by down-regulating DIEXF in Hirschsprung's disease. *BMC Gastroenterol.* 14: 123, 2014.
- Li B, Trueb B. DRG represents a family of two closely related GTP-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1491: 196-204, 2000.
- Li H, Tang J, Lei H, Cai P, Zhu H, Li B, Xu X, Xia Y, Tang W. Decreased MiR-200a/141 suppress cell migration and proliferation by targeting PTEN in Hirschsprung's disease. *Cell. Physiol. Biochem.* 34: 543-553, 2014.
- Li JY, Pu MT, Hirasawa R, Li BZ, Huang YN, Zeng R, Jing NH, Chen T, Li E, Sasaki H, Xu GL. Synergistic function of DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b in the methylation of *Oct4* and *Nanog*. *Mol. Cell. Biol.* 27: 8748-8759, 2007.

- Li S, Wang S, Guo Z, Wu H, Jin X, Wang Y, Li X, Liang S. miARN Profiling Reveals Dysregulation of RET and RET-Regulating Pathways in Hirschsprung's Disease. *PLoS One* 11: e0150222, 2016.
- Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 260: 1130-1132, 1993.
- Lin X. Functions of heparan sulfate proteoglycans in cell signaling during development. *Development* 131: 6009-6021, 2004.
- Lister R, Pelizzola M, Dowen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, Nery JR, Lee L, Ye Z, Ngo QM, Edsall L, Antosiewicz-Bourget J, Stewart R, Ruotti V, Millar AH, Thomson JA, Ren B, Ecker JR. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* 462: 315-322, 2009.
- Liu H, Luo Y, Li S, Wang S, Wang N, Jin X. Expression profiles of HA117 and its neighboring gene DPF3 indifferent colon segments of Hirschsprung's disease. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 7: 3966-3974, 2014.
- Liu JA, Ngan ES. Hedgehog and Notch signaling in enteric nervous system development. *Neurosignals* 22: 1-13, 2014.
- Liu Y, Xu XH, Chen Q, Wang T, Deng CY, Song BL, Du JL, Luo ZG. Myosin Vb controls biogenesis of post-Golgi Rab10 carriers during axon development. *Nat. Commun.* 4: 2005, 2013.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real - time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-408, 2001.
- Lizarraga SB, Margossian SP, Harris MH, Campagna DR, Han AP, Blevins S, Mudbhary R, Barker JE, Walsh CA, Fleming MD. Cdk5rap2 regulates centrosome function and chromosome segregation in neuronal progenitors. *Development* 137: 1907-1917, 2010.
- Lois M. *Nat. Rev. Cancer* 14: 173-186, 2014.
- Lopes C, Chettouh Z, Delabar JM, Rachidi M. The differentially expressed C21orf5 gene in the medial temporal-lobe system could play a role in mental retardation in Down syndrome and transgenic mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305: 915-924, 2003.
- Lu L, Lv Y, Dong J, Hu S, Peng R. DRG1 is a potential oncogene in lung adenocarcinoma and promotes tumor progression via spindle checkpoint signaling regulation. *Oncotarget* 7: 72795-72806, 2016.
- Lum DH, Tan J, Rosen SD, Werb Z. Gene trap disruption of the mouse heparan sulfate 6-O-endosulfatase gene, Sulf2. *Mol. Cell. Biol.* 27: 678-688, 2007.
- Luo Y, Li S, Teng Y, Wang N, Li L, Liu H, Jin X. Differential expression of FOXA1, DUSP6, and HA117 in colon segments of Hirschsprung's disease. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8: 3979-3986, 2015.
- Luzón-Toro B, Gui H, Ruiz-Ferrer M, Sze-Man Tang C, Fernández RM, Sham PC, Torroglosa A, Kwong-Hang Tam P, Espino-Paisán L, Cherny SS, Bleda M, Enguix-Riego M del V, Dopazo J, Antiñolo G, García-Barceló MM, Borrego S. Exome sequencing reveals a high genetic heterogeneity on familial Hirschsprung disease. *Sci. Rep.* 5: 16473, 2015.
- Lv P, Sheng Y, Zhao Z, Zhao W, Gu L, Xu T, Song E. Targeted disruption of Rab10 causes early embryonic lethality. *Protein Cell* 6: 463-467, 2015.
- Ma J, Cao X. Regulation of Stat3 nuclear import by importin alpha5 and importin alpha7 via two different functional sequence elements. *Cell. Signal.* 8: 1117-1126, 2006.
- Majchrzak-Celińska A, Słocińska M, Barciszewska AM, Nowak S, Baer-Dubowska W. Wnt pathway antagonists, SFRP1, SFRP2, SOX17, and PPP2R2B, are methylated in gliomas and SFRP1 methylation

- predicts shorter survival. *J. Appl. Genet.* 57: 189-197, 2016.
- Mandalos N, Rhinn M, Granchi Z, Karampelas I, Mitsiadis T, Economides AN, Dollé P, Remboutsika E. Sox2 acts as a rheostat of epithelial to mesenchymal transition during neural crest development. *Front. Physiol.* 5: 345, 2014.
- Marchesi I, Bagella L. Role of Enhancer of Zeste Homolog 2 Polycomb Protein and Its Significance in Tumor Progression and Cell Differentiation. Primera edición. INTECH Open Access Publisher, 2013.
- Martins-Taylor K, Schroeder DI, LaSalle JM, Lalande M, Xu RH. Role of DNMT3B in the regulation of early neural and neural crests pecifiers. *Epigenetics* 7: 71-82, 2012.
- Mayer W, Niveleau A, Walter J, Fundele R, Haaf T. Demethylation of the Zygotic paternal genome. *Nature* 403: 501-502, 2000.
- Mayor R. The neural crest. *Development* 140: 2247-2251, 2013.
- Merrill RA, Slupe AM, Strack S. N-terminal phosphorylation of protein phosphatase 2A/B β 2 regulates translocation to mitochondria, dynamin-related protein 1 dephosphorylation, and neuronal survival. *FEBS J.* 280: 662-673, 2013.
- Megiorni F, Camero S, Ceccarelli S, McDowell HP, Mannarino O, Marampon F, Pizer B, Shukla R, Pizzuti A, Marchese C, Clerico A, Dominici C. DNMT3B in vitro knocking-down is able to reverse embryonal rhabdomyosarcoma cell phenotype through inhibition of proliferation and induction of myogenic differentiation. *Oncotarget* 7: 79342-79356, 2016.
- McCallion AS, Chakravarti A. EDNRB/EDN3 and Hirschsprung disease type II. *Pigment Cell. Res.* 14: 161-169, 2001.
- Metzger M, Bareiss PM, Danker T, Wagner S, Hennenlotter J, Guenther E, Obermayr F, Stenzl A, Koenigsrainer A, Skutella T, Just L. Expansion and differentiation of neural progenitors derived from the human adult enteric nervous system. *Gastroenterology* 137: 2063-2073.e4, 2009b.
- Metzger M, Caldwell C, Barlow AJ, Burns AJ, Thapar N. Enteric nervous system stem cells derived from human gut mucosa for the treatment of aganglionic gut disorders. *Gastroenterology* 136: 2214-2225.e3, 2009a.
- Morgan MJ, Woltering JM, In der Rieden PMJ, Durston AJ, Thiery JP. YY1 regulates the neural crest-associated Slug gene in *Xenopus laevis*. *J. Biol. Chem.* 279: 46826-46834, 2004.
- Munnes M, Patrone G, Schmitz B, Romeo G, Doerfler W. A5'-CG-3'-rich region in the promoter of the transcriptionally frequently silenced RET proto-oncogene lacks methylated cytidine residues. *Oncogene* 17: 2573-2583, 1998.
- Muñoz-Espín D, Cañamero M, Maraver A, Gómez-López G, Contreras J, Murillo-Cuesta S, Rodríguez-Baeza A, Varela-Nieto I, Ruberte J, Collado M, Serrano M. Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell* 155: 1104-1118, 2013.
- Natarajan D, Marcos-Gutierrez C, Pachnis V, de Graaff E. Requirement of signalling by receptor tyrosine kinase RET for the directed migration of enteric nervous system progenitor cells during mammalian embryogenesis. *Development* 129: 5151-5160, 2002.
- Newgreen D, Young HM. Enteric nervous system: development and developmental disturbances--part 1. *Pediatr. Dev. Pathol.* 5: 224-247, 2002a.
- Newgreen D, Young HM. Enteric nervous system: development and developmental disturbances--part 2. *Pediatr. Dev. Pathol.* 5: 329-349, 2002b.

News & Highlights. *Mucosal Immunology* 1: 328-329, 2008.

Nichane M, Ren X, Bellefroid EJ. Self-regulation of Stat3 activity coordinates cell cycle progression and neural crest specification. *EMBO J.* 29: 55-67, 2010.

Nishikawa R, Hotta R, Shimojima N, Shibata S, Nagoshi N, Nakamura M, Matsuzaki Y, Okano HJ, Kuroda T, Okano H, Morikawa Y. Migration and differentiation of transplanted enteric neural crest-derived cells in murine model of Hirschsprung's disease. *Cytotechnology* 67: 661-670, 2015.

O'Donnell M, Hong CS, Huang X, Delnicki RJ, Saint-Jeannet JP. Functional analysis of Sox8 during neural crest development in *Xenopus*. *Development* 133: 3817-3826, 2006.

Okamoto E, Ueda T. Embryogenesis of intramural ganglia of the gut and its relation to Hirschsprung's disease. *J. Pediatr. Surg.* 2: 437-443, 1967.

Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99: 247-257, 1999.

Ortmann CA, Eisele L, Nüchel H, Klein-Hitpass L, Führer A, Dührsen U, Zeschnigk M. Aberrant hypomethylation of the cancer-testis antigen PRAME correlates with PRAME expression in acute myeloid leukemia. *Ann. Hematol.* 87: 809-818, 2008.

Pattyn A, Morin X, Cremer H, Goridis C, Brunet JF. The homeobox gene *Phox2b* is essential for the development of autonomic neural crest derivatives. *Nature* 399: 366-370, 1999.

Peres R, Furuya H, Pagano I, Shimizu Y, Hokutan K, Rosser CJ. Angiogenin contributes to bladder cancer tumorigenesis by DNMT3b-mediated MMP2 activation. *Oncotarget* 7: 43109-43123, 2016.

Pingault V, Bondurand N, Kuhlbrodt K, Goerich DE, Préhu MO, Puliti A, Herbarth B, Hermans-Borgmeyer I, Legius E, Matthijs G, Amiel J, Lyonnet S, Ceccherini I, Romeo G, Smith JC, Read AP, Wegner M, Goossens M. SOX10 mutations in patients with Waardenburg-Hirschsprung disease. *Nat. Genet.* 18: 171-173, 1998.

Pingault V, Puliti A, Préhu MO, Samadi A, Bondurand N, Goossens M. Human homology and candidate genes for the Dominant megacolon locus, a mouse model of Hirschsprung disease. *Genomics* 39: 86-9, 1997.

Pink RC, Carter DR. Pseudogenes as regulators of biological function. *Essays Biochem.* 54: 103-112, 2013.

Prato AP, Gentilino V, Giunta C, Avanzini S, Mattioli G, Parodi S, Martucciello G, Jasonni V. Hirschsprung disease: do risk factors of poor surgical outcome exist?. *J. Pediatr. Surg.* 43: 612-619, 2008.

Prokhorova EA, Zamaraev AV, Kopeina GS, Zhivotovsky B, Lavrik IN. Role of the nucleus in apoptosis: signaling and execution. *Cell. Mol. Life Sci.* 72: 4593-5612, 2015.

Provost E, Bailey JM, Aldrugh S, Liu S, Iacobuzio-Donahue C, Leach SD. The tumor suppressor *rpl36* restrains KRAS (G12V)-induced pancreatic cancer. *Zebrafish* 11: 551-559, 2014.

Puffenberger EG, Hosoda K, Washington SS, Nakao K, deWit D, Yanagisawa M, Chakravarti A. A missense mutation of the endothelin-B receptor gene in multigenic Hirschsprung's disease. *Cell* 79: 1257-1266, 1994.

Qian XJ, Li YT, Yu Y, Yang F, Deng R, Ji J, Jiao L, Li X, Wu RY, Chen WD, Feng GK, Zhu XF. Inhibition of DNA methyltransferase as a novel therapeutic strategy to overcome acquired resistance to dual PI3K/mTOR inhibitors. *Oncotarget* 6: 5134-5146, 2015.

Rachidi M, Lopes C, Delezoide AL, Delabar JM. *C21orf5*, a human candidate gene for brain abnormalities and mental retardation in Down syndrome. *Cytogenet. Genome Res.* 112: 16-22, 2006.

- Rai K, Jafri IF, Chidester S, James SR, Karpf AR, Cairns BR, Jones DA. Dnmt3 and G9a cooperate for tissue-specific development in zebrafish. *J. Biol. Chem.* 285: 4110–4121, 2010.
- Ramalho-Santos M, Melton DA, McMahon AP. Hedgehog signals regulate multiple aspects of gastrointestinal development. *Development* 127: 2763-2772, 2000.
- Ramsbottom SA, Maguire RJ, Fellgett SW, Pownall ME. Sulf1 influences the Shh morphogen gradient during the dorsal ventral patterning of the neural tube in *Xenopus tropicalis*. *Dev. Biol.* 391: 207-218, 2014.
- Rhee I, Bachman KE, Park BH, Jair KW, Yen RW, Schuebel KE, Cui H, Feinberg AP, Lengauer C, Kinzler KW, Baylin SB, Vogelstein B. DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature* 416: 552-556, 2002.
- Rock JR, Harfe BD. Expression of TMEM16 paralogs during murine embryogenesis. *Dev. Dyn.* 237: 2566-2574, 2008.
- Rossi J, Luukko K, Poteryaev D, Laurikainen A, Sun YF, Laakso T, Eerikäinen S, Tuominen R, Lakso M, Rauvala H, Arumäe U, Pasternack M, Saarma M, Airaksinen MS. Retarded growth and deficits in the enteric and parasympathetic nervous system in mice lacking GFR $\alpha 2$, a functional neurturin receptor. *Neuron* 22: 243-252, 1999.
- Rubinson DA, Dillon CP, Kwiatkowski AV, Sievers C, Yang L, Kopinja J, Rooney DL, Ihrig MM, McManus MT, Gertler FB, Scott ML, Van Parijs L. A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat. Genet.* 33: 401-406, 2003.
- Ruiz-Ferrer M, Torroglosa A, Luzón-Toro B, Fernández RM, Antiñolo G, Mulligan LM, Borrego S. Novel mutations at RET ligand genes preventing receptor activation are associated to Hirschsprung's disease. *J. Mol. Med. (Berl.)* 89: 471-480, 2011.
- Runeberg-Roos P, Saarma M. Neurotrophic factor receptor RET: structure, cell biology, and inherited diseases. *Ann. Med.* 39: 572-580, 2007.
- Sadava DE, Hillis DM, Heller HC, Hacker SD. *Life: The Science of Biology*. Octava edición. Sinauer Associates, Inc. y W.H. Freeman y Co, 2007.
- Sánchez MP, Silos-Santiago I, Frisé J, He B, Lira SA, Barbacid M. Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF. *Nature* 382: 70-73, 1996.
- Sánchez-Díaz A, Blanco MA, Jones N, Moreno S. HBP2: a new mammalian protein that complements the fission yeast MBF transcription complex. *Curr. Genet.* 40: 110-118, 2001.
- Sánchez-Martín FJ, Lindquist DM, Landero-Figueroa J, Zhang X, Chen J, Cecil KM, Medvedovic M, Puga A. Sex- and tissue-specific methylome changes in brains of mice perinatally exposed to lead. *Neurotoxicology* 46: 92-100, 2015.
- Sánchez-Mejías A, Watanabe Y, Fernández RM, López-Alonso M, Antiñolo G, Bondurand N, Borrego S. Involvement of SOX10 in the pathogenesis of Hirschsprung disease: report of a truncating mutation in an isolated patient. *J. Mol. Med. (Berl.)* 88: 507-514, 2010.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 74: 5463-5467, 1977.
- Satijn DPE, Hamer KM, den Blaauwen J, Otte AP. The Polycomb group protein EED interacts with YY1, and both proteins induce neural tissue in *Xenopus* embryos. *Mol. Cell. Biol.* 21: 1360-1369, 2001.
- Sazuka T, Kinoshita M, Tomooka Y, Ikawa Y, Noda M, Kumar S. Expression of DRG during murine embryonic development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189: 371-377, 1992.

- Scarano MI, Strazzullo M, Matarazzo MR, D'Esposito M. DNA methylation 40 years later: Its role in human health and disease. *J. Cell. Physiol.* 204: 21-35, 2005.
- Schmidt K, Kins S, Schild A, Nitsch RM, Hemmings BA, Götz J. Diversity, developmental regulation and distribution of murine PR55/B subunits of protein phosphatase 2A. *Eur. J. Neurosci.* 16: 2039-2048, 2002.
- Schuchardt A, D'Agati V, Larsson-Blomberg L, Costantini F & Pachnis V. Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret. *Nature* 367: 380-383, 1994.
- Schuettengruber B, Chourrout D, Vervoort M, Leblanc B, Cavalli G. Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. *Cell* 128: 735-745, 2007.
- Schuringa JJ, Wojtachnio K, Hagens W, Vellenga E, Buys CH, Hofstra R, Kruijer W. MEN2A-RET-induced cellular transformation by activation of STAT3. *Oncogene* 20: 5350-5358, 2001.
- Scott CE, Wynn SL, Sesay A, Cruz C, Cheung M, Gomez Gavira MV, Booth S, Gao B, Cheah KS, Lovell-Badge R, Briscoe J. SOX9 induces and maintains neural stem cells. *Nat. Neurosci.* 13: 1181-1189, 2010.
- Sham MH, Lui VC, Chen BL, Fu M, Tam PK. Novel mutations of SOX10 suggest a dominant negative role in Waardenburg-Shah syndrome. *J. Med. Genet.* 38: E30, 2001.
- Shao J, Fujiwara T, Kadowaki Y, Fukazawa T, Waku T, Itoshima T, Yamatsuji T, Nishizaki M, Roth JA, Tanaka N. Overexpression of the wild-type p53 gene inhibits NF-kappaB activity and synergizes with aspirin to induce apoptosis in human colon cancer cells. *Oncogene* 19: 726-736, 2000.
- Sharan A, Zhu H, Xie H, Li H, Tang J, Tang W, Zhang H, Xia Y. Down-regulation of miR-206 is associated with Hirschsprung disease and suppresses cell migration and proliferation in cell models. *Sci. Rep.* 5: 9302, 2015.
- Shen Z, Peng L, Zhu Z, Xie H, Zang R, Du C, Chen G, Li H, Xia Y, Tang W. Downregulated Expression of Long NonCoding RNA LOC101926975 Impairs both Cell Proliferation and Cell Cycle and Its Clinical Implication in Hirschsprung Disease Patients. *Int. J. Med. Sci.* 13: 292-297, 2016.
- Shepherd IT, Beattie CE, Raible DW. Functional analysis of zebrafish GDNF. *Dev. Biol.* 231: 420-435, 2001.
- Shepherd IT, Pietsch J, Elworthy S, Kelsh R N, Raible D W. Roles for GFRα1 receptors in zebrafish enteric nervous system development. *Development* 131: 241-249, 2004.
- Sidorova YA, Mätlik K, Paveliev M, Lindahl M, Piranen E, Milbrandt J. Persephin signaling through GFRα1: the potential for the treatment of Parkinson's disease. *Mol. Cell. Neurosci.* 44: 223-232, 2010.
- Siegenthaler JA, Miller MW. Transforming growth factor beta 1 promotes cell cycle exit through the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in the developing cerebral cortex. *J. Neurosci.* 25: 8627-8636, 2005.
- Simões-Costa M, Bronner ME. Establishing neural crest identity: a gene regulatory recipe. *Development* 142: 242-257, 2015.
- Smits AH, Jansen PW, Poser I, Hyman AA, Vermeulen M. Stoichiometry of chromatin-associated protein complexes revealed by label-free quantitative mass spectrometry-based proteomics. *Nucleic Acids Res.* 41: e28, 2013.
- Southard-Smith EM, Angrist M, Ellison JS, Agarwala R, Baxeavanis AD, Chakravarti A, Pavan WJ. The Sox10 (Dom) mouse: modeling the genetic variation of Waardenburg-Shah (WS4) syndrome. *Genome Res.* 9: 215-225, 1999.
- Southard-Smith EM, Kos L, Pavan WJ. Sox10 mutation disrupts neural crest development in Dom

- Hirschsprung mouse model. *Nat. Genet.* 18: 60-64, 1998.
- Sribudiani Y, Metzger M, Osinga J, Rey A, Burns AJ, Thapar N, Hofstra RM. Variants in RET associated with Hirschsprung's disease affect binding of transcription factors and gene expression. *Gastroenterology* 140: 572-582.e2, 2011.
- Stenmark H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.* 10: 513-525, 2009.
- Storer M, Mas A, Robert-Moreno A, Pecoraro M, Ortells MC, Di Giacomo V, Yosef R, Pilpel N, Krizhanovsky V, Sharpe J, Keyes WM. Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell* 155: 1119-1130, 2013.
- Stuhlmiller TJ, García-Castro MI. Current perspectives of the signaling pathways directing neural crest induction. *Cell. Mol. Life Sci.* 69: 3715-3737, 2012.
- Subramaniam D, Thombre R, Dhar A, Anant S. DNA methyltransferases: a novel target for prevention and therapy. *Front. Oncol.* 4: 80, 2014.
- Sukumaran SK, Stumpf M, Salamon S, Ahmad I, Bhattacharya K, Fischer S, Müller R, Altmüller J, Budde B, Thiele H, Tariq M, Malik NA, Nürnberg P, Baig SM, Hussain MS, Noegel AA. CDK5RAP2 interaction with components of the Hippo signaling pathway may play a role in primary microcephaly. *Mol. Genet. Genomics*, 2016.
- Sun G, Yu RT, Evans RM, Shi Y. Orphan nuclear receptor TLX recruits histone deacetylases to repress transcription and regulate neural stem cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104: 15282-15287, 2007.
- Sunagozaka H, Honda M, Yamashita T, Nishino R, Takatori H, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Kaneko S. Identification of a secretory protein c19orf10 activated in hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer* 129: 1576-1585, 2011.
- Takahashi M, Buma Y, Iwamoto T, Inaguma Y, Ikeda H, Hiai H. Cloning and expression of the ret proto-oncogene encoding a tyrosine kinase with two potential transmembrane domains. *Oncogene* 3: 571-578, 1988.
- Tan J, Lee PL, Li Z, Jiang X, Lim YC, Hooi SC, Yu Q. B55 β -associated PP2A complex controls PDK1-directed myc signaling and modulates rapamycin sensitivity in colorectal cancer. *Cancer Cell* 18: 459-471, 2010.
- Tang W, Li B, Tang J, Liu K, Qin J, Wu W, Geng Q, Zhang J, Chen H, Xu X, Xia Y. Methylation analysis of EDNRB in human colon tissues of Hirschsprung's disease. *Pediatr. Surg. Int.* 29: 683638, 2013a.
- Tang W, Qin J, Tang J, Zhang H, Zhou Z, Li B, Geng Q, Wu W, Xia Y, Xu X. Aberrant reduction of MiR-141 increased CD47/CUL3 in Hirschsprung's disease. *Cell. Physiol. Biochem.* 32: 1655-1667, 2013b.
- Tang W, Tang J, He J, Zhou Z, Qin Y, Qin J, Li B, Xu X, Geng Q, Jiang W, Wu W, Wang X, Xia Y. SLIT2/ROBO1-miR-218-1-RET/PLAG1: a new disease pathway involved in Hirschsprung's disease. *J. Cell. Mol. Med.* 19: 1197-1207, 2015.
- Tansey MG, Baloh RH, Milbrandt J, Johnson EM Jr. GFR α -Mediated Localization of RET to Lipid Rafts Is Required for Effective Downstream Signaling, Differentiation, and Neuronal Survival. *Neuron* 25: 611-623, 2000.
- Thapar N. New frontiers in the treatment of Hirschsprung disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 48: S92-94, 2009.
- Theriault FM, Nuthall HN, Dong Z, Lo R, Barnabe-Heider F, Miller FD, Stifani S. Role for Runx1 in the proliferation and neuronal differentiation of selected progenitor cells in the mammalian nervous

- system. *J. Neurosci.* 25: 2050-2061, 2005.
- Thomas G. An encore for ribosome biogenesis in the control of cell proliferation. *Nat. Cell Biol.* 2: E71-72, 2000.
- Tien CL, Jones A, Wang H, Gerigk M, Nozell S, Chang C. Snail2/Slug cooperates with Polycomb repressive complex 2 (PRC2) to regulate neural crest development. *Development* 142: 722-731, 2015.
- Torroglosa A, Enguix-Riego, MV, Fernández RM, Román-Rodríguez FJ, Moya- Jiménez MJ, deAgustín JC, Antiñolo G, Borrego S. Involvement of DNMT3B in the pathogenesis of Hirschsprung disease and its possible role as a regulator of neurogenesis in the human enteric nervous system. *Genet. Med.* 16: 703-710, 2014.
- Torroglosa A, Alves MM, Fernández RM, Antiñolo G, Hofstra RM, Borrego S. Epigenetics in ENS development and Hirschsprung disease. *Dev. Biol.* 417: 209-216, 2016.
- Treanor JJ, Goodman L, de Sauvage F, Stone DM, Poulsen KT, Beck CD, Gray C, Armanini MP, Pollock RA, Hefti F, Phillips HS, Goddard A, Moore MW, Buj-Bello A, Davies AM, Asai N, Takahashi M, Vanden R, Henderson CE, Rosenthal A. Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. *Nature* 382: 80-83, 1996.
- Trojer P, Reinberg D. Histone lysine demethylases and their impact on epigenetics. *Cell* 125: 213-217, 2006.
- Tsui-Pierchala BA, Ahrens RC, Crowder RJ, Milbrandt J, Johnson EM Jr. The long and short isoforms of Ret function as independent signaling complexes. *J. Biol. Chem.* 277: 34618-34625, 2002.
- Umehara Y, Hanaoka K, Watanabe D. Distinct functions of Dnmt3a and Dnmt3b de novo DNA methyltransferases in ES cell proliferation and differentiation. *Stem Cell Discovery* 3: 127-132, 2013.
- Unoki M, Nakamura Y. Methylation at CpG islands in intron 1 of EGR2 confers enhancer-like activity. *FEBS Lett.* 554: 67-72, 2003.
- Ura H, Usuda M, Kinoshita K, Sun C, Mori K, Akagi T, Matsuda T, Koide H, Yokota T. STAT3 and Oct-3/4 control histone modification through induction of Eed in embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* 283: 9713-9723, 2008.
- Vaishnavi V, Manikandan M, Munirajan AK. Mining the 3'UTR of autism-implicated genes for SNPs perturbing microRNA regulation. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 12: 92-104, 2014.
- Viré E, Brenner C, Deplus R, Blanchon L, Fraga M, Didelot C, Morey L, Van Eynde A, Bernard D, Vanderwinden JM, Bollen M, Esteller M, Di Croce L, de Launoit Y, Fuks F. The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature* 439: 871-874, 2006.
- Volarević S, Stewart MJ, Ledermann B, Zilberman F, Terracciano L, Montini E, Grompe M, Kozma SC, Thomas G. Proliferation, but not growth, blocked by conditional deletion of 40S ribosomal protein S6. *Science* 288: 2045-2047, 2000.
- Wallace AS, Barlow AJ, Navaratne L, Delalande JM, Tauszig-Delamasure S, Corset V, Thapar N, Burns AJ. Inhibition of cell death results in hyperganglionosis: implications for enteric nervous system development. *Neurogastroenterol. Motil.* 21: 768-e49, 2009.
- Walton EL, Francastel C, Velasco G. Dnmt3b Prefers Germ Line Genes and Centromeric Regions: Lessons from the ICF Syndrome and Cancer and Implications for Diseases. *Biology (Basel)* 3: 578-605, 2014.
- Wang J, Wu HF, Shen W, Xu DY, Ruan TY, Tao GQ, Lu PH. SRPK2 promotes the growth and migration of the colon cancer cells. *Gene* 586: 41-47, 2016.

- Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 38: e164, 2010.
- Wang S, Ai X, Freeman SD, Pownall ME, Lu Q, Kessler DS, Emerson CP Jr. QSulf1, a heparan sulfate 6- O-endosulfatase, inhibits fibroblast growth factor signaling in mesoderm induction and angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 4833-4838, 2004.
- Wang S, Sun H, Ma J, Zang C, Wang C, Wang J, Tang Q, Meyer CA, Zhang Y, Liu XS. Target analysis by integration of transcriptome and ChIP-seq data with BETA. *Nat. Protoc.* 8: 2502-2515, 2013.
- Wang T, Liu Y, Xu XH, Deng CY, Wu KY, Zhu J, Fu XQ, He M, Luo ZG. Lgl1 activation of Rab10 promotes axonal membrane trafficking underlying neuronal polarization. *Dev. Cell* 21: 431-444, 2011.
- Wang W, Nag S, Zhang X, Wang MH, Wang H, Zhou J, Zhang R. Ribosomal proteins and human diseases: pathogenesis, molecular mechanisms, and therapeutic implications. *Med. Res. Rev.* 35: 225-285, 2015.
- Wienholz BL, Kareta MS, Moarefi AH, Gordon CA, Ginno PA, Chedin F. DNMT3L modulates significant and distinct flanking sequence preference for DNA methylation by DNMT3A and DNMT3B in vivo. *PLoS Genet* 6: e1001106, 2010.
- Wiman KG, Zhivotovsky B. Understanding cell cycle and cell death regulation provides novel weapons against human diseases. *J. Intern. Med.* 281: 483-495, 2017.
- Xia Z, Tong X, Liang F, Zhang Y, Kuok C, Zhang Y, Liu X, Zhu Z, Lin S, Zhang B. Eif3ba regulates cranial neural crest development by modulating p53 in zebrafish. *Dev. Biol.* 381: 83-96, 2013.
- Xie H, Zhu D, Xu C, Zhu H, Chen P, Li H, Liu X, Xia Y, Tang W. Long non coding RNA HOTTIP/HOXA13 act as synergistic role by decreasing cell migration and proliferation in Hirschsprung disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 463: 569-574, 2015.
- Xu XH, Deng CY, Liu Y, He M, Peng J, Wang T, Yuan L, Zheng ZS, Blackshear PJ, Luo ZG. MARCKS regulates membrane targeting of Rab10 vesicles to promote axon development. *Cell Res.* 24: 576-594, 2014.
- Yaqinuddin A, Qureshi SA, Qazi R, Abbas F. Down-regulation of DNMT3b in PC3 cells effects locus-specific DNA methylation, and represses cellular growth and migration. *Cancer Cell Int.* 8: 13, 2008.
- Yntema CL, Hammond WS. The origin of intrinsic ganglia of trunk viscera from vagal neural crest in the chick embryo. *J. Comp. Neurol.* 101: 515-541, 1954.
- Young HM, Hearn CJ, Ciampoli D, Southwell BR, Brunet JF, Newgreen DF. A single rostrocaudal colonization of the rodent intestine by enteric neuron precursors is revealed by the expression of Phox2b, Ret, and p75 and by explants grown under the kidney capsule or in organ culture. *Dev. Biol.* 202: 67-84, 1998.
- Young HM, Hearn CJ, Farlie PG, Canty AJ, Thomas PQ, Newgreen DF. GDNF is a chemoattractant for enteric neural cells. *Dev. Biol.* 229: 503-516, 2001.
- Young HM, Turner KN, Bergner AJ. The location and phenotype of proliferating neural-crest derived cells in the developing mouse gut. *Cell Tissue Res.* 320: 1-9, 2005.
- Yu JS, Cui W. Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination. *Development* 143: 3050-3060, 2016.
- Zakhari S. Alcohol metabolism and epigenetics changes. *Alcohol Res.* 35: 6-16, 2013.
- Zhang X, Wu M, Xiao H, Lee MT, Levin L, Leung YK, Ho SM. Methylation of a single intronic CpG mediates expression silencing of the PMP24 gene in prostate cancer. *Prostate* 70: 765-776, 2010.

- Zhang Z, Harrison P, Gerstein M. Identification and analysis of over 2000 ribosomal protein pseudogenes in the human genome. *Genome Res.* 12: 1466-1482, 2002.
- Zheng D, Frankish A, Baertsch R, Kapranov P, Reymond A, Choo SW, Lu Y, Denoeud F, Antonarakis SE, Snyder M, Ruan Y, Wei CL, Gingeras TR, Guigó R, Harrow J, Gerstein MB. Pseudogenes in the ENCODE regions: consensus annotation, analysis of transcription, and evolution. *Genome Res.* 17: 839-851, 2007.
- Zhou L, Too HP. GDNF family ligand dependent STAT3 activation is mediated by specific alternatively spliced isoforms of GFR α 2 and RET. *Biochim. Biophys. Acta* 1833: 2789-2802, 2013.
- Zhou W, Tian D, He J, Wang Y, Zhang L, Cui L, Jia L, Zhang L, Li L, Shu Y, Yu S, Zhao J, Yuan X, Peng S. Repeated PM_{2.5} exposure inhibits BEAS-2B cell P53 expression through ROS-Akt-DNMT3B pathway-mediated promoter hypermethylation. *Oncotarget* 7: 20691-20703, 2016.
- Zhu D, Xie H, Li H, Cai P, Zhu H, Xu C, Chen P, Sharan A, Xia Y, Tang W. Nidogen-1 is a common target of microRNAs miR-192/215 in the pathogenesis of Hirschsprung's disease. *J. Neurochem.* 134: 39-46, 2015.
- Zou W, Yadav S, DeVault L, Nung Jan Y, Sherwood DR. RAB-10-Dependent Membrane Transport Is Required for Dendrite Arborization. *PLoS Genet* 11: e1005484, 2015.

